

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA VHODNÝCH APLIKAČNÍCH FOREM PRO
ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KAMIL KREMPASKÝ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA VHODNÝCH APLIKAČNÍCH FOREM PRO ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

PREPARATION OF SOME APPLICATION FORMULA OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KAMIL KREMPASKÝ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0936/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Kamil Krempaský	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Příprava vhodných aplikačních forem pro antimikrobiální látky

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše k dané problematice
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod
3. Experimentální studie
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kamil Krempaský
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Táto práca sa zameriava na štúdium antimikrobiálneho pôsobenia extraktov z vybraných bylín, následnú enkapsuláciu týchto extraktov a enkapsuláciu lyzozýmu. V teoretickej časti bola spracovaná literárna rešerš zaoberajúca sa problematikou prírodných antimikrobiálnych látok, na základe ktorej boli vybraté testované bylinky. Extrakty pripravené z paliny pravej (*Artemisia absinthium*), materinej dúšky (*Thymus serpyllum*), koreňa echinacey purpurovej (*Echinacea purpurea*), sladovky hladkoplodej (sladkého drievka) (*Glycyrrhiza glabra*), nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis*) a plodov rakytníka rašetliakového (*Hippophae rhamnoides*) boli najskôr charakterizované na obsah polyfenolov, flavonoidov a celkovú antioxidačnú aktivitu. Ďalej boli tieto extrakty enkapsulované do lipozómov a rovnako bol enkapsulovaný aj lyzozým. Následne bola sledovaná stabilita týchto častíc vo vodnom prostredí. Antimikrobiálna aktivita týchto látok v enkapsulovanom aj neenkapsulovanom stave bola testovaná na bakteriálnych kmeňoch *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*, voči ktorým, väčšina vybraných extraktov vykazovala antimikrobiálnu aktivitu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

Antimikrobiálne pôsobenie, bylinné extrakty, lyzozým, antioxidanty, polyfenoly, flavonoidy, lipozómy, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

The main aim of this study is to determine antimicrobial activity of herbal extracts and also encapsulate these extracts and lysozyme to liposomes. The extracts were prepared from above ground part of wormwood (*Artemisia absinthium*), aerial part of breckland thyme (*Thymus serpyllum*), the root of purple coneflower (*Echinacea purpurea*), liquorice (*Glycyrrhiza glabra*), corolla of pot marigold (*Calendula officinalis*) and berries of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). In all extracts antioxidant activity and the amount of total polyphenols and flavonoids was determined. All of these extracts and also lysozyme were used for encapsulation to liposomes. Prepared liposomes were then tested for their stability. Further, encapsulated as well as free extracts were tested for their antimicrobial activity on *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis*. Extract from *Echinacea purpurea* showed the highest antimicrobial activity.

KEYWORDS

Antimicrobials, herbal extracts, lysozyme, antioxidants, polyphenols, flavonoids, liposomes, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*

KREMPASKÝ, K. *Příprava vhodných aplikačních forem pro antimikrobiální látky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 51 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brně a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcel by som sa poďakovať prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc., za pomoc a vedenie pri tejto práci. Rovnako, by som sa chcel poďakovať aj Ing. Petre Matouškovej za jej trpezlivosť a cenné rady, ktoré mi pri tejto práci pomohli.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická časť	9
2.1	Antimikrobiálne látky	9
2.2	Antioxidanty	9
2.2.1	Polyfenoly	9
2.2.2	Flavonoidy	9
2.3	Rastliny s potenciálnym antimikrobiálnym účinkom.....	10
2.3.1	Palina pravá (<i>Artemisia absinthium</i>).....	10
2.3.2	Materina dúška (<i>Thymus serpyllum</i>)	10
2.3.3	Echinacea purpurová (<i>Echinacea purpurea</i>)	10
2.3.4	Sladovka hladkoplodá (Sladké drierko) (<i>Glycyrrhiza glabra</i>).....	10
2.3.5	Nechtík lekársky (<i>Calendula officinalis</i>)	11
2.3.6	Rakytník rašetliakový (<i>Hippophae rhamnoides</i>)	11
2.4	Lyzozým	11
2.5	Mikroorganizmy	11
2.5.1	<i>Escherichia coli</i>	12
2.5.2	<i>Serratia marcescens</i>	12
2.5.3	<i>Bacillus subtilis</i>	12
2.5.4	<i>Micrococcus luteus</i>	12
2.6	Antimikrobiálne testy	13
2.6.1	Bujónové dilučné metódy	13
2.6.2	Difúzne metódy.....	13
2.7	Lipozomy.....	13
2.8	Vybrané metódy analýzy	14
2.8.1	Prietoková cytometria	14
2.8.2	Metóda dynamického rozptylu svetla	15
2.8.3	Zeta potenciál.....	16
3	cieľ práce.....	17
4	Experimentálna časť	18
4.1	Použité prístroje a chemikálie.....	18
4.1.1	Použité chemikálie	18
4.1.2	Použité prístroje a pomôcky	18
4.1.3	Antimikrobiálne látky a látky použité na enkapsuláciu	18

4.1.4	Použité mikroorganizmy	19
4.2	Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity, flavonoidov, polyfenolov a celkových proteínov	19
4.2.1	Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou použitia ABTS	19
4.2.2	Stanovenie celkových flavonoidov	19
4.2.3	Stanovenie celkových polyfenolov	20
4.2.4	Stanovenie celkových proteínov metódou Hartree-Lowry	20
4.3	Kultivácia mikroorganizmov	20
4.3.1	Príprava média pre <i>E. coli</i>	20
4.3.2	Príprava média pre <i>Bacillus subtilis</i>	21
4.3.3	Príprava média pre <i>Micrococcus luteus</i> a <i>Serratia marcescens</i>	21
4.4	Príprava bylinných extraktov.....	21
4.5	Príprava lipozómov pomocou ultrazvuku.....	21
4.6	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti lipozómov	21
4.7	Antimikrobiálne testy	21
4.7.1	Stanovenie koncentrácie a viability buniek prietokovou cytometriou.....	21
4.7.2	Agarový difúzny test.....	22
4.7.3	Dilučný test	22
5	Výsledky a diskusia	23
5.1	Stanovenie antioxidačnej aktivity.....	23
5.2	Stanovenie celkových polyfenolov	24
5.2.1	Stanovenie obsahu polyfenolov vybraných bylín v rôznych extraktoch	24
5.3	Stanovenie celkových flavonoidov.....	25
5.3.1	Stanovenie obsahu flavonoidov vybraných bylín	25
5.4	Stanovenie koncentrácie proteínov.....	26
5.5	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti	26
5.5.1	Enkapsulačná účinnosť lyzozýmu.....	27
5.5.2	Enkapsulačná účinnosť bylinných extraktov	27
5.6	Vizualizácia častíc pomocou optického mikroskopu	28
5.7	Stanovenie veľkosti lipozómov	29
5.8	Stabilita lipozómov.....	33
5.9	Dlhodobá stabilita enkapsulovaných zložiek do častíc	34
5.10	Antimikrobiálne testy	35
5.10.1	Test na pevnom médiu	35

5.10.2	Stanovenie koncentrácie a viability buniek prietokovou cytometriou	36
5.10.3	Test na mikrotitračných doštičkách	37
5.10.3.1	Antimikrobiálne účinky lysozýmu	38
5.10.3.2	Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň <i>E. coli</i>	39
5.10.3.3	Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň <i>S. marcescens</i>	40
5.10.3.4	Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň <i>M. luteus</i>	41
5.10.3.5	Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň <i>B. subtilis</i>	42
5.10.3.6	Antimikrobiálne účinky lipozómov s enkapsulovanými extraktmi	43
6	Záver	46
7	Zdroje	48

1 ÚVOD

Hlavnou náplňou tejto práce je štúdium antimikrobiálneho pôsobenia niektorých bylinných extraktov. V súčasnosti je narastajúca rezistencia baktérií voči bežným antibiotikám, vplyvom nevhodného alebo nadmerného používania, vážnym problémom. Je to dôvod, prečo vedci hľadajú nové spôsoby v boji proti týmto, voľným okom neviditeľným, organizmom. Čoraz častejšie sa využívajú rastliny, ktoré sú po stáročia známe a využívané najmä v tradičných medicínach rôznych kultúr. Tieto rastliny sa často vyznačujú najmä vysokým obsahom antioxidantov, polyfenolov, flavonoidov a iných bioaktívnych látok, ktoré priaznivo vplyvajú na ľudský organizmus. Medzi takéto rastliny patrí aj rakytník rašetliakový, ktorý je najviac rozšírený v Ázii. Plody tejto rastliny s ostňami sú známe aj vysokým obsahom vitamínu C. Zo semien tejto rastliny sa získavajú oleje, ktoré našli svoje uplatnenie najmä v medicíne a kozmetike. V týchto odvetviach má široké uplatnenie aj echinacea purpurová, ktorá je rozšírená najmä v USA. Známe sú predovšetkým etanolové extrakty, ktoré sa užívajú na podporu imunity najmä v zimných mesiacoch. S etanolom sa spája aj extrakt z paliny pravej, ktorý sa pridáva do likéru absintu. Tento bol z dôvodu spôsobovania absintinizmu v mnohých krajinách zakázaný. Nechtík lekársky a rovnako aj materina dúška sú v Európe známe rastliny, využívané tiež v medicíne. Najmä materina dúška je vďaka svojej príjemnej vôni často používaná v kozmetických prípravkoch. V medicíne a aj na výrobu sladkostí sa využíva koreň sladkého drievka obsahujúci množstvo biologicky účinných látok, jednou z ktorých je aj glycyrizín, ktorý je 50-krát sladší než cukor.

Kým tradičná medicína využíva pri aplikácii týchto extraktov aj tradičné postupy, moderná medicína posunula hranice oveľa ďalej, dokonca až do mikrosvetu. Čoraz intenzívnejšie sú diskutované možnosti, ako zvýšiť účinnosť danej liečby zacielením účinnej látky na presné miesto potreby. Jedným z možných riešení je uzavrieť aktívnu látku do malých častíc, napr. lipozómov, ktoré by ju bez straty aktivity dopravili na miesto určenia. Tým by sa maximalizoval účinok tejto látky a minimalizovali by sa prípadné nežiaduce účinky na okolité tkanivá. Problémom pri vnútornom použití však ešte stále zostáva presnosť doručenia danej látky do požadovaného miesta a stabilita počas transportu. Okrem takýchto transportných systémov sa pracuje aj na vývoji mikrorobotov, ktoré by problém v tele opravili bez nutnosti väčšieho invazívneho zákroku. Mikro- a nanomedicína je veľmi perspektívnym odvetvím a môže predstavovať výrazný posun vpred pri liečbe často aj veľmi závažných ochorení.

Táto práca sa zameriava na štúdium možnosti enkapsulácie a stanovenie antimikrobiálnej aktivity prírodných extraktov z vybraných bylín a na enkapsuláciu lyzozýmu do lipozómov. Lipozómy sú častice zložené z fosfolipidovej membrány obaľujúcej priestor s vodnou fázou. Ich vlastnosti umožňujú transportovať ako hydrofilné, tak aj hydrofóbne látky. Tieto vezikuly je možné využiť pre systémovú aplikáciu aktívnych látok cez kožu alebo sliznicu a mohli by byť použité napr. v potravinárstve alebo v kozmetike ako súčasť krémov, prípadne gélov.

Výsledkom ďalšej komplexnejšej práce by mohol byť takýto antimikrobiálny gél, prípadne krém, obsahujúci vyextrahované len látky s výhradne antimikrobiálnym účinkom uzavreté v lipozómoch, ktoré by ich chránili pred prípadnou degradáciou a zaručovali presné doručenie týchto zložiek na miesto určenia.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Antimikrobiálne látky

Antimikrobiálne látky sú látky, ktoré pôsobia proti mikróbom (najčastejšie baktériám) a sú to často látky, ktoré produkujú huby alebo aj iné mikroorganizmy. Rozdeľujú sa na baktériostatické, ktoré reverzibilne zabraňujú množeniu mikroorganizmov a baktériocídne, ktoré baktérie zabíjajú. Tieto substancie majú rozličný mechanizmus pôsobenia. Inhibujú syntézu bunkovej steny, syntézu nukleových kyselín, proteínov alebo esenciálnych metabolitov a spôsobujú tak dezintegráciu bakteriálnej bunky [1,2]. Mnohé zlúčeniny patriace do skupiny antioxidantov ako napr. taníny a katechíny obsiahnuté v rastlinách majú aj antimikrobiálne účinky. Tieto účinky súvisia so štruktúrou molekuly, pri ktorej má veľký význam umiestnenie a počet hydroxylových skupín. Zvýšená hydroxylácia vedie ku zvýšenej účinnosti voči mikroorganizmom [3,4,5].

2.2 Antioxidanty

Sú to látky, ktoré inhibujú oxidáciu a tým sú schopné neutralizovať škodlivé účinky oxidácie v tkanivách a obmedziť tak poškodenie bunkových zložiek vznikajúcich v dôsledku reakcií zahŕňajúcich voľné radikály [6,7]. Voľné radikály majú kľúčovú úlohu vo fundamentálnych bunkových reakciách, následkom čoho je aj oxidatívny stres, ktorý môže byť dôležitý pre patofyziológiu ochorení ako napr. ateroskleróza, chronické ochorenie obličiek a diabetes mellitus, starnutie buniek, vzniku rakoviny a ďalších ochorení [9]. Každá bunka má ochranný mechanizmus pôsobiaci proti škodlivým efektom voľných radikálov ako napr. superoxiddismutáza, glutatiónpoxidáza, glutatiónereduktáza, tioredoxín a iné. Vitamín E (α -tokoferol) je esenciálny vitamín prijímaný potravou, ktorý je účinný antioxidant narušajúci reťazovú reakciu voľných radikálov tým, že zabraňuje ich šíreniu. Medzi neenzymatické antioxidanty patria aj karotenoidy, flavonoidy a polyfenoly. Významnými zdrojmi antioxidantov sú ovocie, zelenina a obilie [7,8].

2.2.1 Polyfenoly

Polyfenoly sú látky charakteristické prítomnosťou jednej alebo viacerých fenolových skupín v ich štruktúre. Vlastnosťou týchto látok je schopnosť eliminovať reaktívne formy kyslíka a rozličných organických substrátov, ktorá sa dostala do oblasti záujmu v prevencii viacerých chronických chorôb spojených s oxidatívnym stresom ako napr. kardiovaskulárne ochorenia, rakovina atď. [9]. Vysoké zastúpenie polyfenolov je v čiernom a zelenom čaji. Viaceré štúdie dokazujú, že katechínové frakcie z čierneho a zeleného čaju, najmä epigalokatechíngalát (EGCG) a epikatechíngalát (ECG) inhibujú rast mnohých bakteriálnych druhov a majú aj účinky proti zubnému kazu [10].

2.2.2 Flavonoidy

Je to skupina polyfenolických zlúčenín, ktorá je rozmanitá svojou štruktúrou. Sú to antioxidanty, lapače voľných radikálov a priaznivo vplývajú na kardiovaskulárnu sústavu. Flavonoidy sa vyskytujú v rastlinách a do tejto triedy patria flavóny, katechíny, antokyanídy, izoflavóny a chalkóny [11].

2.3 Rastliny s potenciálnym antimikrobiálnym účinkom

2.3.1 Palina pravá (*Artemisia absinthium*)

Palina pravá je striebrosivá aromatická rastlina s výrazne horkou chuťou. Má malé kvety, zelenej až žltej farby. Jej horká chuť je spôsobená prítomnosťou absintínu a anabsintínu. Okrem týchto látok obsahuje aj iné seskviterpénové laktóny, mono- a seskviterpény, esenciálne oleje obsahujúce deriváty tujónu a flavonoidy. Tieto esenciálne oleje sa vyznačujú antimikrobiálnou a antifungálnou aktivitou. V ľudovom liečiteľstve je táto rastlina dobre známa a extrakty z nej sa používajú napr. proti črevným parazitom alebo horúčke. Extrakt z paliny pravej podporuje chuť do jedla a pomáha pri tráviacich ťažkostiach. Výťažok z paliny pravej je hlavnou ingredienciou absintu, likéru, ktorý bol veľmi populárny najmä medzi parížskou bohémou na prelome 18. a 19. storočia a ktorého užívanie môže indukovať vizuálne halucinácie, epilepsiu, poškodenie mozgu a zvýšené riziko psychického ochorenia. Tieto účinky sa pripisujú najmä tujónu, ktorý sa v tomto extrakte nachádza [12,13].

2.3.2 Materina dúška (*Thymus serpyllum*)

Táto rastlina je poloker s malými ružovými až fialkastými kvetmi a podlhovastými listami, ktoré po rozdrvení príjemne voňajú. Hlavnou zložkou materinej dúšky sú monoterpény. Z esenciálnych olejov sú najviac zastúpené tymol, cervacrol a p-cymén. Táto aromatická rastlina má antiseptické, diaforetické a analgetické vlastnosti, preto sa používa do ústnych vôd, kloktadiel, proti kašľu a nachladnutiu. Obsiahnuté esenciálne oleje obsahujú aj látky, ktoré stimulujú imunitný systém v boji voči infekciám. Olej zmierňuje reumatizmus a tiež sa používa pri vypadávaní vlasov [14].

2.3.3 Echinacea purpurová (*Echinacea purpurea*)

Echinacea purpurová je trváca bylina s drsnými, podlhovastými listami a purpurovými kvetmi. Je hojne využívaná pri liečbe akútnych infekcií horných dýchacích ciest, infekcií močového traktu, vírusových ochoreniach a zápaloch kože. Echinacea dokáže stimulovať rozličné bunky imunitného systému vrátane makrofágov a má protizápalový účinok. Aktívnymi látkami echinacey sú polysacharidy, flavonoidy, alkylamidy, polyacetylény a éterické oleje [15,16]. Koreň echinacey obsahuje v porovnaní s nadzemnými časťami rastliny viac éterických olejov a pyrolizidíniových alkaloidov ako napr. tuzilangín a izotuzilangín. Hlavnými aktívnymi zložkami nadzemnej časti sú alkamidy, polyacetylény, a deriváty kyseliny kávovej a ferulovej, ktoré sú efektívne antioxidanty [15]. Antimikrobiálny účinok bol pozorovaný pri extrakte z byliny aj koreňa echinacey purpurovej. Okrem toho, extrakt z tejto rastliny má aj antifungálnu aktivitu, ktorá bola pozorovaná pri rozličných druhoch rodu *Candida* [16].

2.3.4 Sladovka hladkoplodá (Sladké drievko) (*Glycyrrhiza glabra*)

Sladovka hladkoplodá je trváca bylina, ktorá má dlhý vretenovitý koreň a stopkaté strapce s modrofialovými kvetmi. Ide o medicínsky významnú rastlinu, ktorej najvyužívanejšou časťou je koreň. Z chemického hľadiska, obsahuje koreň tejto rastliny v najvyššom zastúpení triterpény ako glycyrrizín, flavóny, izoflavóny a chalkóny. Tieto a ostatné zlúčeniny

obsiahnuté v rastline sú príčinou jej detoxikačných, protizápalových, antimikrobiálnych, antiaterogénnych a protivírusových vlastností [17,18].

2.3.5 Nechtík lekársky (*Calendula officinalis*)

Nechtík lekársky je jednoročná rastlina s oranžovožltými až oranžovými kvetmi, ktoré sa na noc zatvárajú. Z chemického hľadiska obsahuje vysoký podiel karotenoidov ako flavoxantín, rubixantín, β -karotén a lykopén, ktorý má antimikrobiálne, antioxidačné a antiproliferatívne vlastnosti. Uplatnenie v medicíne si táto rastlina našla pri liečbe zápalov a kožných rán. Má priaznivý účinok pri peptických vredoch a zápaloch sliznice žalúdka a dvanástnika a vykazuje aj aktivitu voči mikroorganizmom. Okvetné lístky sa dajú použiť aj pri farbení vlny, bavlny alebo ľanu a v súčasnosti je nechtík lekársky používaný v kozmetike, parfumoch, farmaceutických preparátoch a rovnako aj v jedle [19].

2.3.6 Rakytník rašetliakový (*Hippophae rhamnoides*)

Rakytník rašetliakový je ker s kvetmi žltkastej farby, ktorého plody sú oranžovožlté bobule, z ktorých sa pripravujú nápoje, marmelády, sladkosti a kozmetické prípravky. Veľmi široké uplatnenie má v tradičnej čínskej a stredoázijskej medicíne. Hlavú skupinu chemických látok obsiahnutých v bobuliach tvoria karotenoidy, tokoferoly, steroly, flavonoidy, lipidy, kyselina askorbová a taníny. Mnohé z týchto látok majú antioxidačné, protirakovinové, hepatoprotektívne vlastnosti a pôsobia stimulačne na imunitný systém. Fenolické zlúčeniny z bobúľ inhibujú rast gramnegatívnych baktérií [20].

2.4 Lyzozým

Lyzozým je proteín, s veľkosťou 14 300 Da, ktorý vo svojom polypeptidovom reťazci obsahuje 129 aminokyselín [21]. Patrí do skupiny muramidáz, skupiny enzýmov s antimikrobiálnym účinkom, ktorý sa prejavuje poškodením bunkovej steny baktérie tak, že katalyzuje hydrolýzu β -1,4-väzieb medzi N-acetylmurámovou kyselinou a N-acetyl-D-glukozamínom v peptidoglykánoch a medzi N-acetyl-D-glukozamínovmi zvyškami v chitodextrínoch. Touto svojou schopnosťou je účinný pri lýze bunkovej steny gramnegatívnych aj grampozitívnych baktérií [22]. Prirodzene sa vyskytuje ako v rastlinných, tak aj v živočíšnych tkanivách a sekrétoch ako slzy, sliny a materské mlieko. Chráni vstupné cesty do organizmu ako sú sliznice a slúži ako obrana proti baktériám [21,22,23].

2.5 Mikroorganizmy

Sú to organizmy mikroskopických rozmerov, ktoré sa rozdeľujú na prokaryotické (baktérie) a eukaryotické (kvasinky a plesne). Najrozmanitejšiu skupinu mikroorganizmov tvoria baktérie. Sú to organizmy rôznych tvarov, napr. koky, tyčiky, špirály, ktorých veľkosť sa pohybuje okolo 0,3-2,0 μm . Baktérie sa podľa Gramovho farbenia rozdeľujú na grampozitívne a gramnegatívne. Grampozitívne baktérie obsahujú vo svojej bunkovej stene hrubú vrstvu peptidoglykánu, v dôsledku čoho si udržiavajú farbivo po aplikácii alkoholu a farbía sa tak na modro. Gram-negatívne, ktoré obsahujú vo svojej bunkovej stene tenkú vrstvu peptidoglykánu a vrstvu z lipopolysacharidov, ktorú alkohol poškodzuje, preto sa prvotne aplikované farbivo vymýva a bunky sa následnou aplikáciou karbolfuchsinu alebo safranínu zafarbía do ružova až červena [24].

2.5.1 *Escherichia coli*

E. coli je skupina gram-negatívnych, fakultatívne anaeróbných baktérií tyčinkového tvaru patriacich do druhu enterobaktérií. Symbioticky sa vyskytuje v hrubom čreve endotermných živočíchov, hlavne jej apatogénne a fakultatívne patogénne kmene. Pre hostiteľa sú prospešné, pretože produkujú vitamín K a zabraňujú usídľovaniu sa patogénnych baktérií v čreve. Prítomnosť tejto baktérie vo vode alebo jedle je indikátorom fekálneho znečistenia [2,25]. Niektoré kmene tejto baktérie sú patogénne, produkujú toxíny, napr. shiga toxín, a spôsobujú hnačku, infekcie močového traktu a iné závažné infekcie. Táto baktéria sa v laboratórnych podmienkach ľahko kultivuje, jej rast je relatívne rýchly a aj preto zohrala dôležitú úlohu pri rozvoji biotechnológií a molekulárnom klonovaní. V súčasnosti je v týchto odvetviach stále využívaná, napríklad geneticky pozmenené kmene na produkciu špecifických proteínov a enzýmov [25,26].

2.5.2 *Serratia marcescens*

Táto baktéria patrí do skupiny gram-negatívnych, fakultatívne anaeróbných baktérií tyčinkového tvaru, ktorá patrí tiež do rodu enterobaktérií, od ktorých sa odlišujú schopnosťou produkovať tri druhy hydrolytických enzýmov: DNáza, gelatináza a lipáza [2,27]. Majú peritrichálne bičíky, ktoré im zabezpečujú pohyb [27]. Niektoré kmene tejto baktérie produkujú červený pigment prodigiozín. Ako pôvodca infekcie sa *Serratia marcescens* uplatňuje najmä v nemocniciach, pri pacientoch s oslabenou imunitou a drogovu závislých spôsobuje sepsu, endokarditídu, meningitídu, infekcie dýchacieho, urogenitálneho traktu a infekcie rán [2].

2.5.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je v prírode hojne rozšírený a je ho možné izolovať zo vzoriek pôdy, vody aj vzduchu. Je to gram-pozitívna, aeróbná baktéria tyčinkového tvaru s peritrichálnymi bičkmi, ktorá sa rozmnožuje priečnym delením. V nepriaznivých podmienkach vytvára endospóry, ktoré sú vysoko termorezistentné, čo sa využíva ako indikátor sterilizácie v mikrobiológii, farmácii aj potravinárstve, kedy pri správnych podmienkach tohto procesu (dostatočne vysoká teplota) je zabránené spóram vyklíčiť. Vyznačuje sa aj produkciou viacerých enzýmov ako proteázy, amylázy a pektinázy. Produkuje aj proteolytický enzým subtilisín, ktorý vo vysokých dávkach môže spôsobiť alergické reakcie [28].

2.5.4 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus je aeróbná, gram-pozitívna baktéria patriaca do druhu Micrococcaceae, ktorej veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 1-1,8 µm. Bunky sú guľového tvaru a vyskytujú sa v nepravidelných zhlukoch, tetrádach, alebo pároch. Nemajú bičíky, ktoré by im zabezpečovali pohyb a rovnako ani netvorí spóry. Tieto baktérie sú hojne rozšírené a dajú sa nájsť na koži ľudí a iných zvierat, v pôde, morskej i sladkej vode a aj vo vzduchu. Vo všeobecnosti sú považované za neškodné a dajú sa nájsť na koži a slizniciach, napr. ústna dutina alebo horné dýchacie cesty. Pri ľuďoch s oslabenou imunitou môžu baktérie tohto druhu spôsobovať rôzne infekcie. *Micrococcus luteus* bol označený ako pôvodca ochorenia v niektorých prípadoch pneumónie, endokarditídy, vnútrolebečného abscesu a meningitídy [29].

2.6 Antimikrobiálne testy

Cieľom testovania je detekcia možnej odolnosti mikroorganizmov voči antimikrobiálnej látke, respektíve overenie jej antimikrobiálnej aktivity. Medzi hlavné a najpoužívanjšie testovacie metódy patria dilučné a difúzne metódy.

2.6.1 Bujónové dilučné metódy

Pri tomto teste je možné stanoviť najnižšiu koncentráciu antimikrobiálnej látky, ktorá inhibuje rast a rozmnožovanie mikroorganizmu (MIC), ale aj najnižšiu koncentráciu tejto látky, ktorá pôsobí baktericídne (MBC) [24]. Do rady testovacích skúmaviek (alebo na mikrotitračnú doštičku) s tekutým médiom, obsahujúcim vzostupnú koncentráciu antimikrobiálnej látky, sú očkované baktérie, ktoré sú následne pri vhodnej teplote kultivované. Ako minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) je vyhodnotená najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky v skúmavke, v ktorej nie je viditeľný bakteriálny rast, čo sa prejaví ako absencia zákalu. Prítomnosť zákalu je možné vyhodnotiť vizuálne alebo turbidimetricky [30]. Skúmavka, ktorá nevykazovala bakteriálny rast môže byť preočkovaná na pevné alebo tekuté médium neobsahujúce antimikrobiálnu látku. Ak toto médium po kultivácii vykazuje bakteriálny rast, antimikrobiálna látka v danej koncentrácii nebola baktericídna a je možné určiť minimálnu baktericídnu koncentráciu (MBC) [24].

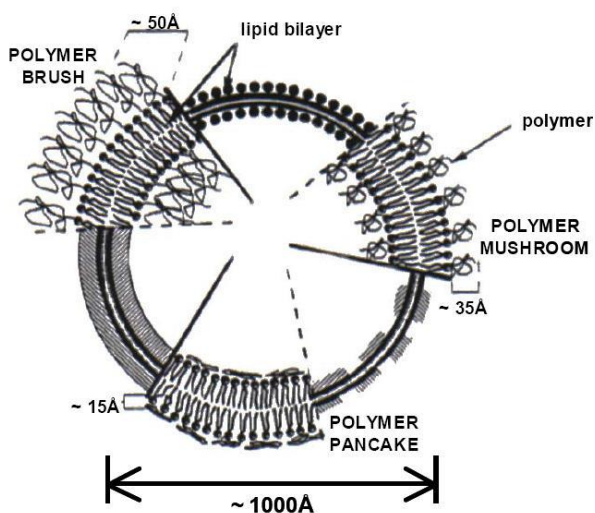
2.6.2 Difúzne metódy

Najpoužívanjšou metódou je disková difúzna metóda, známa aj ako Kirby-Bauerov test. Pri tomto teste je bakteriálna kultúra nariadená na danú koncentráciu a následne je aplikovaná na agarovú platňu, na ktorú sú prikladané papierové disky obsahujúce presnú koncentráciu antimikrobiálnej látky. Počas inkubácie difunduje antimikrobiálna látka z disku do agaru. Ak je táto látka voči danému mikroorganizmu účinná, vytvorí sa okolo disku inhibičná zóna, ktorá sa odmeria. Všeobecne platí, že čím väčšia je táto zóna, tým viac je daný mikroorganizmus voči použitej látke citlivejší. Tento test je avšak len kvalitatívny, kedy sa dá podľa veľkosti inhibičnej zóny vyhodnotiť či daný mikroorganizmus je voči použitej antimikrobiálnej látke citlivý, stredne citlivý alebo rezistentný. Pokročilejším testom, ktorý je založený na rovnakom princípe je takzvaný E-test. Plastové pásiky obsahujú gradient antimikrobiálnej látky a podľa vytvorenej inhibičnej zóny sa dá priamo na nich odčítať minimálna inhibičná koncentrácia [24,30].

2.7 Lipozómy

Lipozómy sú vezikuly mikroskopických rozmerov, ktoré môžu byť umelo pripravené a použité ako globulárne nosiče, v ktorých je enkapsulovaná aktívna látka [31]. Pozostávajú z vodného jadra obklopeného jednou alebo viacerými dvojvrstvami fosfolipidov, majúcich hydrofilnú hlavičku tvorenú polárnou skupinou a hydrofóbny chvostík, ktorý je tvorený dlhším uhlíkovodíkovým reťazcom. Pri ich vzniku sa hydrofóbne molekuly orientujú tak, aby mali čo najmenší kontakt s vodnou fázou a naopak hydrofilné molekuly sa orientujú ku vodnej fáze smerom dovnútra a rovnako aj smerom k vodnej fáze do vonkajšieho prostredia [31,32]. Pri enkapsulácii sa látky lipofilného charakteru sa skoro kompletne zachytávajú do lipidovej dvojvrstvy, pričom silne hydrofilné sa vyskytujú len vo vodnom kompartmente. Existuje viacero typov lipozómov. Unilamelárne lipozómy majú veľké vodné jadro a skladajú

sa len z jednej fosfolipidovej dvojvrstvy. Ich priemer sa pohybuje v rozmedzí 50-250 nm a preferenčne sa používajú na enkapsuláciu vo vode rozpustných látok. Multilamelárne lipozómy sa skladajú z viacerých koncentricky usporiadaných fosfolipidových dvojvrstiev. Ich rozmery sa pohybujú v rozmedzí 1-5 μm . Vysoký podiel lipidov im umožňuje pasívne zachytiť lipofilné látky [32]. Keďže membrána lipozómu má veľmi podobné zloženie ako koža, môže sa do nej ľahko integrovať, pri čom sa aktívna látka uzavretá vo vnútri uvoľní a môže plniť svoju funkciu. Prázdne lipozómy sú tiež prospešné, z dôvodu obsahu fosfatidylcholínu, ktorý sa skladá kyseliny linolovej a cholínu [31]. Pre zvýšenie akumulácie lipozómového liečiva v požadovanom tkanive boli navrhnuté tzv. cielečné lipozómy. Tieto na sebe obsahujú naviazané skupiny, napr. monoklonálne protilátky, peptidy, sacharidy a iné, ktoré rozpoznávajú a špecificky sa naviažu na cieľové tkanivo čo umožní ich prienik, respektíve prienik enkapsulovanej látky do tkaniva [32]. V súčasnosti sa lipozómy používajú ako biokompatibilné nosiče liečiv, proteínov alebo aj DNA pre farmaceutické, kozmetické a biochemické účely [31].



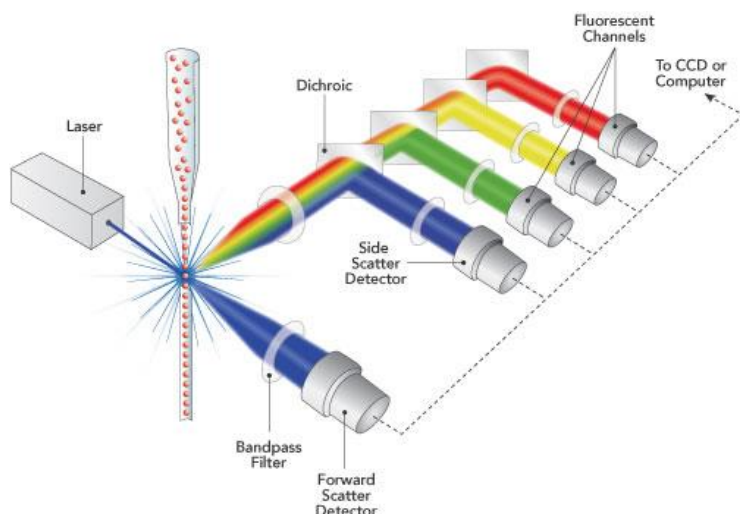
Obrázok 1: Lipozóm s modifikovaným povrchom [31]

2.8 Vybrané metódy analýzy

2.8.1 Prietoková cytometria

Je to bioanalytická metóda umožňujúca meranie a zároveň aj analýzu viacerých fyzikálnych charakteristík individuálnych častíc, zvyčajne buniek, ktoré sa dajú rozlíšiť na základe veľkosti, štruktúry, povrchových vlastností, vnútrobunkovej zložitosti a intenzity fluorescence [33]. Tieto, prechádzajú jednotlivou za sebou prostredníctvom hydrodynamickej fokusácie v prúde tekutiny cez lúč svetla emitovaného laserom. Toto svetlo je pri prechode buniek rozptýlené do priameho smeru, v uhle až do 20° vzhľadom k osi lasera, a bočného smeru, v 90° uhle. Priamy rozptyl svetla obsahuje informáciu o relatívnej veľkosti buniek a je možné tiež rozlíšiť bunkovú debris od žijúcich buniek. Bočný rozptyl svetla hovorí o miere granularity bunky. Bunky môžu byť fluorescenčne označené protilátkou, alebo priamo fluorescenčne zafarbené. Pri absorpcii svetelnej energie emitujú fluorochrómy týchto farbív svetlo s vyššou vlnovou dĺžkou, ktoré je zachytávané optickým systémom, cez ktorý sa dostáva k príslušným detektorom. Tento signál je zosilnený a vyhodnotený počítačom. Spektrum použitia prietokovej cytometrie je široké a siaha od určenia počtu a sortovania

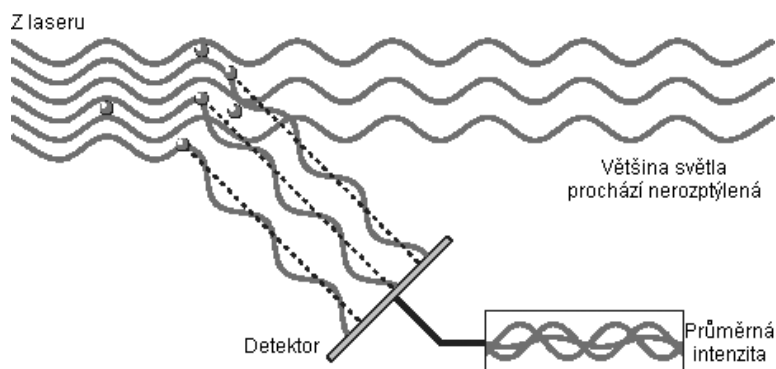
buniek cez rôzne analýzy funkcií bunky, rezistencii voči antibiotikám, až po analýzy DNA a analýzy bunkového cyklu [34,35].



Obrázok 2: Prietokový cytometer [35]

2.8.2 Metóda dynamického rozptylu svetla

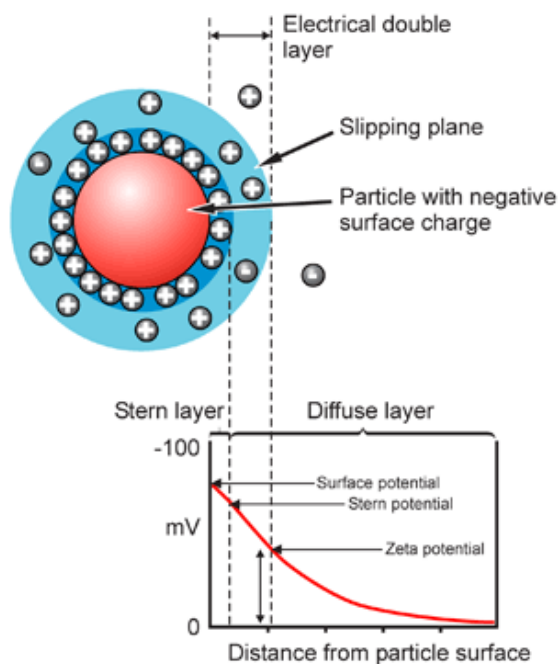
Dynamický rozptyl svetla (DLS - dynamic light scattering) je metóda, pomocou ktorej je možné merať veľkosť koloidných častíc, ktorá sa pohybuje v submikrónovej oblasti. Princípom je meranie fluktuácie intenzity rozptýleného svetla, emitovaného laserom, okolo jej priemernej hodnoty. Koloidné častice sa pohybujú v roztoku Brownovým pohybom a to spôsobuje fluktuáciu intenzity rozptýleného svetla. Rýchlosť pohybu častice je priamo úmerná rýchlosti zmeny intenzity rozptýleného svetla. Dôležitým rysom je aj to, že malé častice sa pohybujú rýchlejšie a väčšie pomalšie. Veľkosť častíc je vypočítaná zo získaných informácií s použitím Stokes-Einsteinovej rovnice a vhodných korelačných funkcií pomocou počítačového softvéru a výsledkom je distribučná funkcia analyzovaného súboru častíc. Dôležitým krokom pri tejto metóde je plnenie meracej kyvety, pretože pri prítomnosti prachu alebo mikrobublínky môže dôjsť k prekrytiu signálu analytu. Pri použití meracej kyvety s vloženou elektródou je možné merať aj zeta potenciál. Táto metóda je využívaná pri charakterizácii emulzií, micel ale aj pri práci s baktériami, proteínmi a DNA [36,37].



Obrázok 3: Metóda DLS [37]

2.8.3 Zeta potenciál

Zeta potenciál (elektrokinetický potenciál) označuje veľkosť potenciálovej bariéry častíc v koloidnej disperzii, čo je potenciál na rovine sklzu medzi časticou a difúznou vrstvou s obklopujúcim rozpúšťadlom. Ak častice v roztoku nebudú mať vysoký kladný alebo záporný zeta potenciál, dôjde ich fluktuácii a začnú sa vytvárať vločky. Častice s hodnotami zeta potenciálu vyššími ako +30 mV a zápornejšími ako -30 mV tvoria stabilnú suspenziu. Tento náboj častíc je závislý od hodnoty pH roztoku. Elektrokinetické efekty (elektroforéza, elektroosmóza, potenciál prúdenia a sedimentačný potenciál) sú významným dôsledkom prítomnosti tohto náboja na časticiach [38].



Obrázok 4: Zeta potenciál [39]

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto práce je príprava vhodných aplikačných foriem pre antimikrobiálne látky a testovanie stability týchto prípravkov, najmä pre aplikáciu do kozmetiky.

V rámci tejto práce boli plnené nasledujúce ciele:

1. Vypracovanie rešerše so zameraním na danú problematiku
2. Zavedenie a optimalizácia potrebných metód pre enkapsuláciu, testovanie antimikrobiálneho účinku a analýza aktívnych zložiek
3. Porovnanie antimikrobiálneho účinku a stability vybraných látok v časticiach

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité prístroje a chemikálie

4.1.1 Použité chemikálie

Lysozym from chicken egg white - Sigma-Aldrich (Nemecko)
Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (Nemecko)
Agar Powder, Himedia (India)
LB médium (Luria-Berthani), Sigma-Aldrich (Nemecko)
Pepton, Himedia (India)
Hovädzí extrakt, Difco laboratories (USA)
Ethanol - Vitrum–LachNer (ČR)
Lecitín zo sóje - Serva (Nemecko)
Cholesterol – zmes hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu - Serva (Nemecko)
ABTS(2,2–azinobis(3–ethylbenzothioazolin-6-sulfonoová kyselina)-Sigma-Aldrich(Nemecko)
Peroxodisíran draselný - Sigma-Aldrich (Nemecko)
Hydrogenuhličitan sodný (p.a.) - Vitrum–LachNer (ČR)
Uhličitan sodný – Vitrum (p.a.) – LachNer (ČR)
Hydroxid sodný- Vitrum (p.a.) – LachNer (ČR)
Pentahydrát síranu meďnatého (p.a.) - Vitrum–LachNer (ČR)
Kyselina gallová- Sigma-Aldrich (Nemecko)
Kyselina citrónová (p.a.) - Vitrum–LachNer (ČR)
Chlorid hlinitý (p.a.) - Vitrum–LachNer (ČR)
Chlorid sodný (p.a.) - Vitrum–LachNer (ČR)
Dusitan sodný (p.a.) - Vitrum–LachNer (ČR)
Katechín- Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.1.2 Použité prístroje a pomôcky

Analytické váhy, Boeco, (Nemecko)
Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
Centrifúga, Sartorius Sigma (Nemecko)
Magnetická miešačka, Lavat (ČR)
Koloidný DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)
Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline (Nemecko)
Ultrazvukový vodný kúpeľ PS02000 (ČR)
Spektrofotometer – Helios γ , Unicam (VB)
Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/ ∞ LED (ČR)
Software Dino-Capture 2.0 (ČR)

4.1.3 Antimikrobiálne látky a látky použité na enkapsuláciu

Ako antimikrobiálne zložky boli v tejto práci použité lysozým a rôzne bylinné extrakty z nasledujúcich sušených bylín: palina pravá, materina dúška, echinacea purpurová - koreň, sladké drierko, nechtík lekárskeý a rakytník rašetliakový - plod.

4.1.4 Použité mikroorganizmy

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity boli v experimentálnej časti práce použité bakteriálne kultúry *Micrococcus luteus* CCM1569, *Bacillus subtilis* CCM2794, *Esterichia coli* CCM7395 a *Serratia marcesnes* CCM8587, ktoré boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

4.2 Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity, flavonoidov, polyfenolov a celkových proteínov

Pre zistenie koncentrácie celkových proteínov, flavonoidov, polyfenolov a proteínov bola zostrojená kalibračná krivka popisujúca závislosť absorbancie pripravených roztokov so známymi koncentraciami, pri určitej vlnovej dĺžke. Roztoky boli pripravené metódami pre stanovenie týchto jednotlivých látok. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke odpovedajúcej pre danú metódu.

4.2.1 Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou použitia ABTS

Ide o metódu hodnotiacu elimináciu syntetických radikálov. Štandardné kalibračné roztoky s koncentraciami 50-400 µg/ml Troloxu boli vytvorené rozpustením tejto látky v roztoku 60-percentného etanolu. Ako východisková hodnota pre odčítanie absorbancie bol použitý 1 ml roztoku ABTS^{•+} a 10 µl 60% etanolu. Rozpustením ABTS vo vode bol pripravený roztok s koncentráciou 7 mmol/l a radikálový kation ABTS^{•+} bol získaný reakciou pripraveného roztoku s roztokom peroxodisíranu draselného s koncentráciou 2,45 mmol/l. Takto pripravený roztok bol odložený do tmy pri izbovej teplote a po dvanástich hodinách bol vhodný na použitie. Pred použitím bol roztok ABTS^{•+} zriedený etanolom, aby absorbancia pri 734 nm bola 0,700 ± 0,02. Samotné meranie prebehlo v zúženej kyvete, do ktorej bolo napipetované 1 ml ABTS^{•+}, ku ktorému bolo pridaných 10 µl extraktu vzorky a v desiatej minúte bol zaznamenaný pokles absorbancie. Antioxidačná aktivita bola vypočítaná z rovnice regresie Troloxu, pričom dosadzovaná hodnota bol pokles absorbancie delený absorbanciou v nulte minúte.

4.2.2 Stanovenie celkových flavonoidov

Rozpustením v etanole bol pripravený zásobný roztok katechín hydrátu s koncentráciou 1 mg/ml, z ktorého bolo pripravených šesť kalibračných roztokov s koncentraciami 0,03 - 0,3 mg/ml. Z každého z týchto kalibračných roztokov bolo odobraté po 0,5 ml. K tomuto množstvu bolo pridané po 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Roztoky boli premiešané na prístroji vortex a boli ponechané pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút. Potom bolo pridané po 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, roztoky boli znovu premiešané a ponechané pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút. Následne bolo pridaných po 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného s koncentráciou 1 mol/dm³ a po 1 ml destilovanej vody. Roztoky boli znovu premiešané a boli ponechané pri laboratórnej teplote 15 minút. Nakoniec bola zmeraná absorbancia pri 510 nm. Ako slepá vzorka bol použitý roztok, ktorý miesto vzorky obsahoval destilovanú vodu.

4.2.3 Stanovenie celkových polyfenolov

Z roztoku kyseliny gallovej bolo pripravených sedem kalibračných roztokov s koncentráciou 0,1 – 0,7 mg/ml. Ku 0,5 µl z každého kalibračného roztoku bolo pridané po 1 ml vody a po 1 ml Folin-Ciocalteu činidla, ktoré bolo zriedené destilovanou vodou v pomere 1:9. Tieto roztoky boli premiešané a po 5 minútach stánia pri laboratórnej teplote bolo pridané po 1,5 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného. Roztoky boli premiešané a po 15 minútach pri laboratórnej teplote bola zmeraná absorbancia pri 750 nm. Ako slepá vzorka bol použitý roztok, ktorý miesto vzorky obsahoval destilovanú vodu.

4.2.4 Stanovenie celkových proteínov metódou Hartree-Lowry

Z roztoku proteínu s koncentráciou 0,3 mg/ml bolo vytvorených sedem kalibračných štandardných roztokov s koncentraciami 30 – 120 mg/ml proteínu. Ku každému kalibračnému roztoku bolo následne pridané 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A, roztoky v skúmavkách boli premiešané na prístroji vortex a boli inkubované 10 minút pri teplote 50 °C. Po tejto dobe boli ochladené na laboratórnu teplotu, bolo k nim pridané po 0,1 ml Hartree-Lowryho činidla B, roztoky boli znovu premiešané. Po desiatich minútach pri laboratórnej teplote bolo k týmto roztokom pridané po 3 ml zriedeného Folin-Ciocalteu činidla (pomer 1:15, destilovanou vodou) a roztoky boli znova inkubované pri 50 °C po dobu 10 minút. Nakoniec bola zmeraná absorbancia pri 650 nm. Ako slepá vzorka bol použitý roztok obsahujúci miesto proteínu destilovanú vodu.

Príprava Hartree-Lowry činidla A:

Bolo pripravených 50 ml roztoku hydroxidu sodného s koncentráciou 1 mol/dm³, v ktorom bolo rozpustených 10 g uhličitanu sodného a 1 g tetrahydrátu vínanu sodno-draselného. Následne bol tento roztok doplnený destilovanou vodou na objem 100 ml.

Príprava Hartree-Lowry činidla B:

Bolo pripravených 10 ml roztoku hydroxidu sodného s koncentráciou 1 mol/dm³, v ktorom bol rozpustený 1 g pentahydrátu síranu meďnatého a 2 g tetrahydrátu vínanu sodno-draselného. Následne bol tento roztok doplnený destilovanou vodou na objem 100 ml.

4.3 Kultivácia mikroorganizmov

Ako testovacie organizmy boli zvolené dva druhy gramnegatívnych baktérií – *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* a dva druhy grampozitívnych baktérií – *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*. Pri kultivácii týchto mikroorganizmov boli použité kvapalné aj tuhé médiá, ktoré boli pripravené podľa špecifických nárokov jednotlivých druhov baktérií. Príslušné médiá mali objem 50 ml boli po dobu 30 minút sterilizované v tlakovom hrnci.

4.3.1 Príprava média pre *E. coli*

Tekuté médium, komerčné LB médium, obsahujúce tryptón, kvasničný extrakt a chlorid sodný bolo pripravené podľa návodu na koncentráciu 25 g/l. Na prípravu tuhého média bol pridaný agar, aby jeho koncentrácia v médiu bola 20 g/l.

4.3.2 Príprava média pre *Bacillus subtilis*

Na kultiváciu bolo použité tekuté médium, ktoré obsahovalo peptón s koncentráciou 5 g/l, hovädzí extrakt s koncentráciou 3 g/l a 0,01 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. V prípade tuhého média bol pridaný ešte agar s koncentráciou 20 g/l.

4.3.3 Príprava média pre *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*

Tekuté médium obsahovalo peptón s koncentráciou 5 g/l, hovädzí extrakt s koncentráciou 3 g/l a NaCl s koncentráciou 3 g/l. Tuhé médium obsahovalo navyše agar, ktorého koncentrácia bola 20 g/l.

4.4 Príprava bylinných extraktov

Extrakty boli vytvorené z navážky 0,1 g príslušnej sušenej bylinky, ktorá bola zaliata vriacou vodou s objemom 10 ml, pričom doba lúhovania bola 15 minút. Rovnakým spôsobom bolo postupované aj pri vytvorení extraktov s 5% kyselinou citrónovou a etanolom.

4.5 Príprava lipozómov pomocou ultrazvuku

Sójový lecitín s hmotnosťou 90 mg bol spolu s 10 mg cholesterolu rozmiešaný v 10 ml daného extraktu. Tento roztok bol pomocou tyčového ultrazvuku emulgovaný pri výkone 70% po dobu jednej minúty, pričom kadička s roztokom bola ponorená do misky so studenou vodou, aby sa predišlo zahrievaniu emulgovaného roztoku, čo by malo negatívny vplyv na vznikajúce častice.

4.6 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti lipozómov

Z pripravených emulzií extraktov s lipozómami bolo odoberaté po 1 ml do skúmaviek Eppendorf, ktoré boli po dobu piatich minút pri 14 800 otáčkach za minútu centrifugované. Zo supernatantu bola odoberatá vzorka pre stanovenie koncentrácie danej látky príslušnou metódou spektrofotometricky. Enkapsulačná účinnosť bola vypočítaná z rozdielu obsahu stanovovanej látky v roztoku pred a po enkapsulácii.

4.7 Antimikrobiálne testy

Antimikrobiálna aktivita pripravených extraktov a lyzozýmu bola sledovaná pomocou prístroja ELISA a na agarových platniach. Bylinné extrakty boli pripravené z 1 g príslušnej sušenej bylinky a 10 ml vody.

4.7.1 Stanovenie koncentrácie a viability buniek prietokovou cytometriou

Pre stanovenie viability buniek a ich počtu bola využitá prietoková cytometria. Pred samotným meraním boli jednotlivé kultúry vždy vhodne nariadené. Pri všetkých testovaných kmeňoch bol zostavený kalibračný rad koncentrácií a následne bol stanovený počet buniek. Pri rovnakých vzorkách bola zmeraná aj absorbancia pri vlnovej dĺžke 630 nm. Z týchto výsledkov bola zostavená kalibračná závislosť absorbancie na počte buniek.

Pri stanovení viability buniek bol k 10x zriedeným vzorkám pridaný propídium jodid (5 $\mu\text{l/ml}$), ktorý sa používa na zafarbenie mŕtvych buniek. Po následnej inkubácii v tme, pri izbovej teplote, bola stanovená viabilita buniek.

4.7.2 Agarový difúzny test

Princíp tohto testu je podobný ako pri agarovej difúznej metóde, odsek 2.6.2, s rozdielom, že pri tejto metóde bolo do jamôk, vopred vyhlbených sterilnou pipetou, aplikovaných 80 μ l príslušného bylinného extraktu a roztoku lyzozýmu s danými koncentráciami. Každá agarová platňa obsahovala aj jamku s vodou pre porovnanie. Vytvorené inhibičné zóny boli odmerané pravítkom.

4.7.3 Dilučný test

Do jamôk mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných po 150 μ l suspenzie daného druhu baktérií, ku ktorým bolo pridaných 50 μ l extraktu danej bylinky. Blanky byliniek boli vytvorené z 50 μ l daného extraktu a 150 μ l vody. Blanky pre jednotlivé druhy baktérií boli vytvorené zo 150 μ l suspenzie buniek daného druhu a 50 μ l vody. Pomocou prístroja ELISA bola meraná absorbancia pri 630 nm. Na tento test boli použité bakteriálne kultúry v čase 0. Absorbancia bola meraná v čase nula, po troch a dvadsiatich štyroch hodinách.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

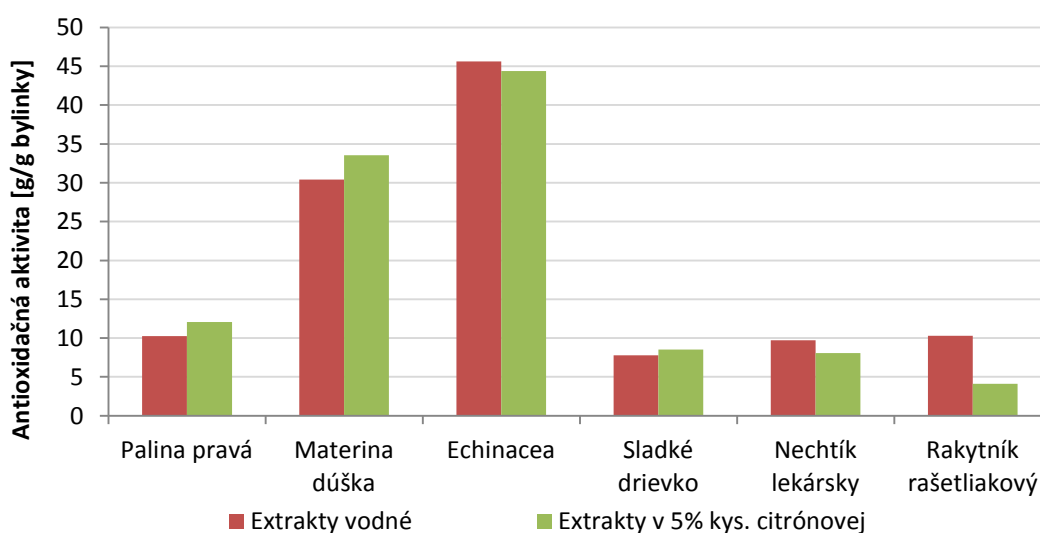
Táto práca bola zameraná na štúdium enkapsulácie prírodných antimikrobiálnych extraktov z vybraných bylín a na enkapsuláciu lyzozýmu. Pre možnosť enkapsulácie boli testované extrakty z paliny pravej, materinej dúšky, koreňa echinacey purpurovej, sladkého drievka, nechtíka lekárskeho a rakytníka rašetliakového. Tieto extrakty boli najskôr charakterizované a následne použité na enkapsuláciu, pri ktorej bola sledovaná stabilita vzniknutých častíc v modelovom vodnom prostredí. Okrem toho, bola sledovaná aj antimikrobiálna účinnosť týchto extraktov a lyzozýmu na vybrané bakteriálne kmene.

5.1 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita bola stanovená pre vodné extrakty a aj extrakty v 5% kyseline citrónovej. Meranie prebehlo podľa postupu uvedenom v kapitole 5.1, pričom každé prebehlo trikrát a pre výpočet bol použitý priemer nameraných hodnôt. Následne bola vypočítaná antioxidačná aktivita z rovnice regresie Troloxu, $y = 0,00138912 \times [\mu\text{g/ml}]$. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 1 a na obrázku 5.

Tabuľka 1: Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita [mg/g bylinky]	Palina pravá	Materina dúška	Echinacea koreň	Sladké drievko	Nechtík lekársky	Rakytník rašetliakový
Extrakty vodné	10,27 ±0,007	30,43 ±0,044	45,63 ±0,016	7,77 ±0,004	9,73 ±0,016	10,29 ±0,320
Extrakty v 5% kys. citrónovej	12,07 ±0,005	33,55 ±0,029	44,39 ±0,020	8,51 ±0,006	8,05 ±0,0155	4,10 ±0,0179



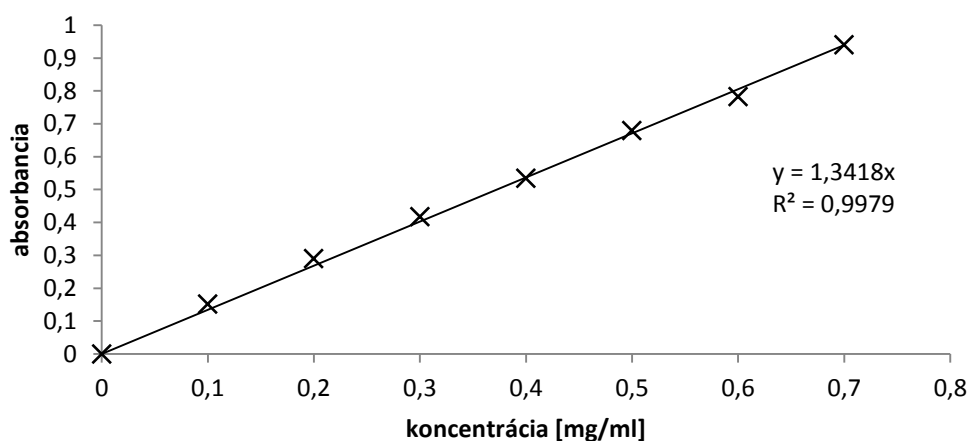
Obrázok 5: Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita vodných a kyslých extraktov bola veľmi podobná, čo je možné vidieť na obrázku 1. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazuje vodný extrakt z koreňa echinacey

a naopak, najnižšia antioxidačná aktivita bola zaznamenaná pri extrakte rakytníka v 5% kyseline citrónovej.

5.2 Stanovenie celkových polyfenolov

Koncentrácia polyfenolov bola vypočítaná z regresnej rovnice priamky (Obr.6) popisujúcej kalibračnú závislosť kyseliny gallovej, pripravenej podľa návodu v kapitole 4.2.3. Všetky merania boli vykonané trikrát a pre výpočet bola použitá priemerná hodnota.



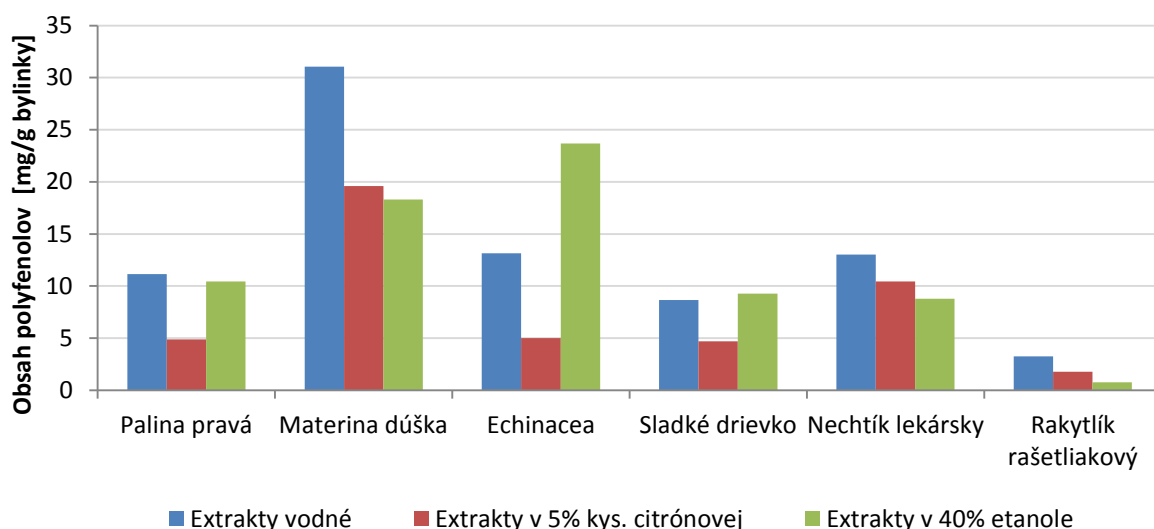
Obrázok 6: Kalibračná krivka kyseliny gallovej (750nm)

5.2.1 Stanovenie obsahu polyfenolov vybraných bylín v rôznych extraktoch

Výsledné koncentrácie polyfenolov pre jednotlivé bylinky boli prepočítané na miligramy polyfenolov obsiahnuté v grame bylinky. Výsledné koncentrácie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 2.

Tabuľka 2: Obsah polyfenolov

Obsah polyfenolov [mg/g bylinky]	Palina pravá	Materina dúška	Echinacea koreň	Sladké drievko	Nechtík lekársky	Rakytlík rašetliakový
Extrakty vodné	11,16 ±0,004	31,07 ±0,006	13,14 ±0,004	8,67 ±0,001	13,02 ±0,003	3,27 ±0,002
Extrakty v 5% kys. citrónovej	4,87 ±0,007	19,60 ±0,004	5,00± 0,007	4,71 ±0,002	10,44 ±0,002	1,77 ±0,004
Extrakty v 40% etanole	10,45 ±0,001	18,31 ±0,003	23,68 ±0,011	9,29 ±0,009	8,80 ±0,007	0,77 ±0,007

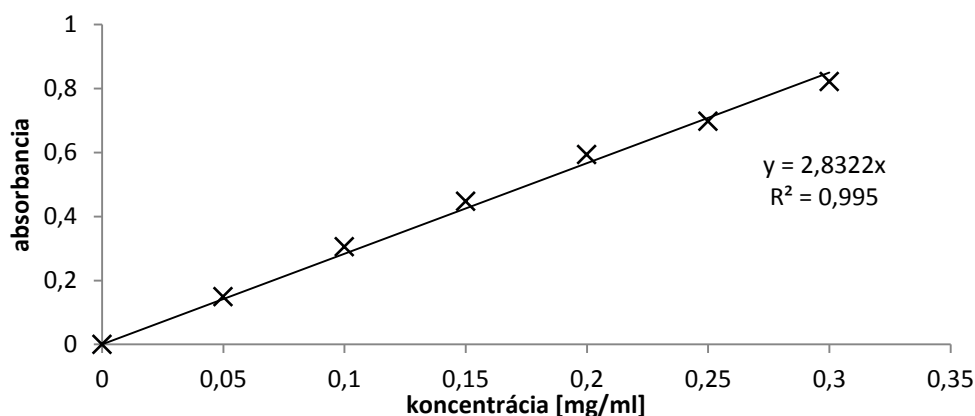


Obrázok 7: Obsah polyfenolov

Z obrázku 7 je viditeľné, že obsah celkových polyfenolov bol v prípade vodných extraktov vyšší ako v prípade extraktov v 5% kyseline citrónovej, a preto boli pre enkapsuláciu použité vodné extrakty. V prípade extraktov v 40% etanole bol celkový obsah polyfenolov vyšší ako pri vodných extraktoch len pri extrakte z echinacey a sladkého drierka. Pri vodných extraktoch bol najvyšší obsah polyfenolov zaznamenaný pri extrakte z materinej dúšky a najnižší obsah týchto látok bol v extrakte z rakytníka.

5.3 Stanovenie celkových flavonoidov

Koncentrácia celkových flavonoidov bola vypočítaná z rovnice regresie priamky pre kalibračnú závislosť katechínu, podľa postupu uvedeného v kapitole 4.2.2 (Obr.8). Všetky merania boli uskutočnené trikrát a pre výpočet bola použitá priemerná hodnota.



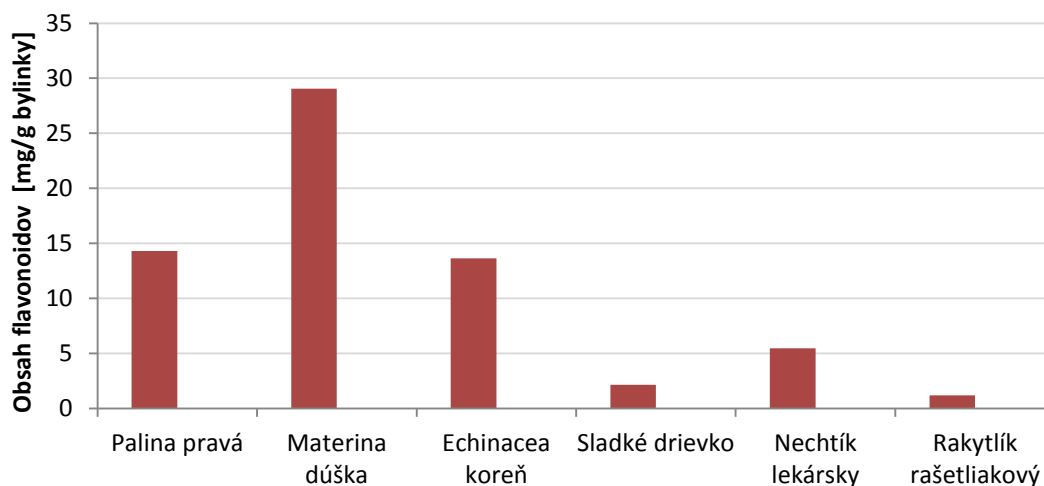
Obrázok 8: Kalibračná krivka katechínu (510 nm)

5.3.1 Stanovenie obsahu flavonoidov vybraných bylín

Celková koncentrácia flavonoidov, pre jednotlivé bylinky, bola prepočítaná na miligramy polyfenolov obsiahnuté v jednom grame bylinky. Výsledné koncentrácie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 4.

Tabuľka 3: Obsah flavonoidov

Obsah flavonoidov	Palina pravá	Materina dúška	Echinacea koreň	Sladké drievko	Nechtík lekársky	Rakytlík rašetliakový
[mg/g bylinky]	14,313 ±0,023	29,046 ±0,043	13,646 ±0,016	2,141 ±0,003	5,452 ±0,013	1,177 ±0,010

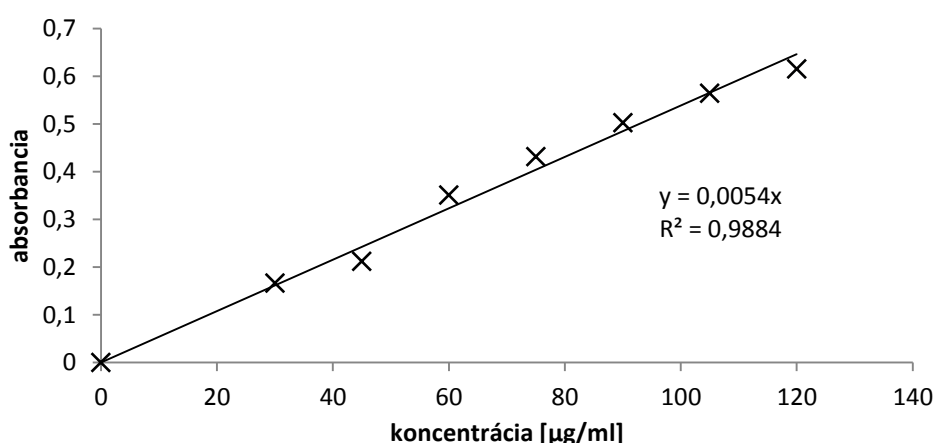


Graf 4: Obsah flavonoidov

Najvyšší obsah flavonoidov bol stanovený v extrakte z paliny pravej. Najmenej flavonoidov obsahoval extrakt z rakytníka rašetliakového.

5.4 Stanovenie koncentrácie proteínov

Koncentrácia lyzozýmu bola vypočítaná z rovnice regresie priamky pre kalibračnú závislosť lyzozýmu, ktorá bola zostavená metódou stanovenia celkových proteínov podľa Hartree-Lowryho (Obr.7). Presný postup je uvedený v kapitole 4.2.4. Merania boli vykonané trikrát a pre výpočet bola použitá priemerná hodnota.



Obrázok 9: Kalibračná krivka lyzozýmu (650nm)

5.5 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti

Enkapsulačná účinnosť lyzozýmu a jednotlivých bylinných extraktov bola stanovená spektrofotometricky, na základe stanovenia prítomnosti voľných zložiek v roztoku. Z hodnôt

stanovovanej látky, pred a po enkapsulácii, bola vypočítaná enkapsulačná účinnosť, ktorá je uvedená v % zložky, ktorá bola uzavretá do častíc.

5.5.1 Enkapsulačná účinnosť lyzozýmu

Roztok lyzozýmu, aj s časticami po enkapsulácii, bol centrifugovaný 5 minút pri 14 800 ot./min. Spektrofotometricky, metódou Hartree-Lowry, bola v supernatante stanovovaná koncentrácia voľného lyzozýmu, ktorá bola porovnaná s hodnotou koncentrácie voľného lyzozýmu stanoveného v roztoku pred enkapsuláciou (Tab.6). Z týchto dvoch hodnôt bola vypočítaná enkapsulačná účinnosť danej metódy, ktorej postup je uvedený v kapitole 4.5. Všetky merania boli uskutočnené trikrát a pre výpočet bol použitý priemer nameraných hodnôt.

Tabuľka 5: Enkapsulačná účinnosť lyzozýmu

Koncentrácia lyzozýmu v roztoku pred enkapsuláciou	Koncentrácia lyzozýmu v roztoku po enkapsulácii	Enkapsulačná účinnosť
1,05±0,003 mg/ml	0,08±0,018 mg/ml	91,9 %

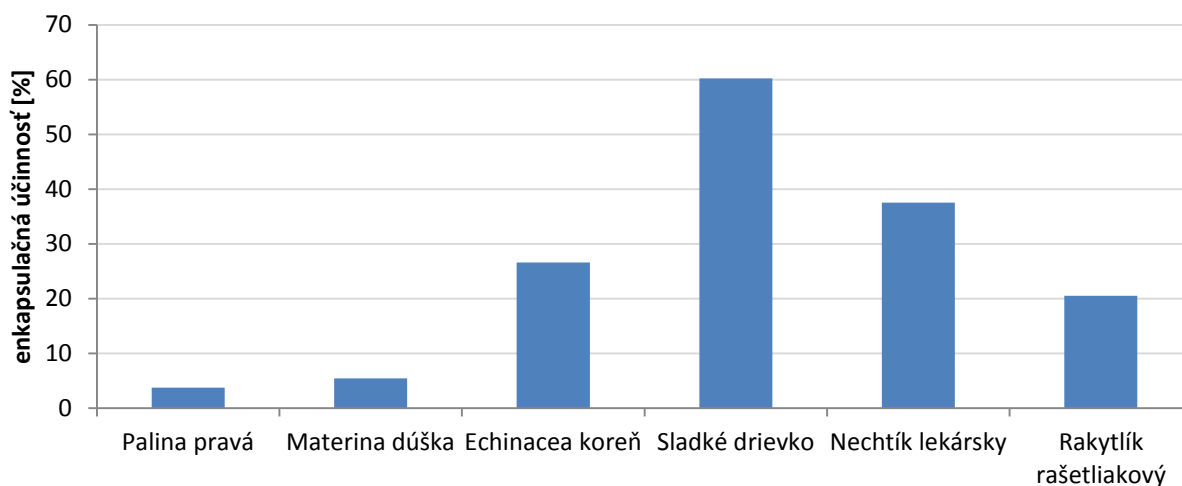
5.5.2 Enkapsulačná účinnosť bylinných extraktov

Bylinné extrakty aj s lipozómami po enkapsulácii boli centrifugované 5 minút pri 14 800 ot./min. Koncentrácia voľných polyfenolov v supernatante bola stanovovaná spektrofotometricky a porovnaná s koncentráciou voľných polyfenolov v roztoku pred enkapsuláciou (Tab.7).

Z týchto hodnôt bola vypočítaná enkapsulačná účinnosť použitej metódy ktorá je popísaná v kapitole 4.5. Merania boli uskutočnené trikrát a pre výpočet boli použité priemery nameraných hodnôt.

Tabuľka 6: Enkapsulačné účinnosti bylinných extraktov

obsah polyfenolov v roztoku	Palina pravá	Materina dúška	Echinacea koreň	Sladké drierko	Nechtík lekársky	Rakytlík rašetliakový
pred enkapsuláciou [mg/ml]	0,112 ±0,004	0,315 ±0,006	0,136 ±0,004	0,088 ±0,001	0,135 ±0,003	0,033 ±0,002
po enkapsulácii [mg/ml]	0,108 ±0,003	0,298 ±0,003	0,099 ±0,011	0,034 ±0,007	0,084 ±0,005	0,026 ±0,003
enkapsulačná účinnosť [%]	3,7	5,4	26,6	60,2	37,5	20,5

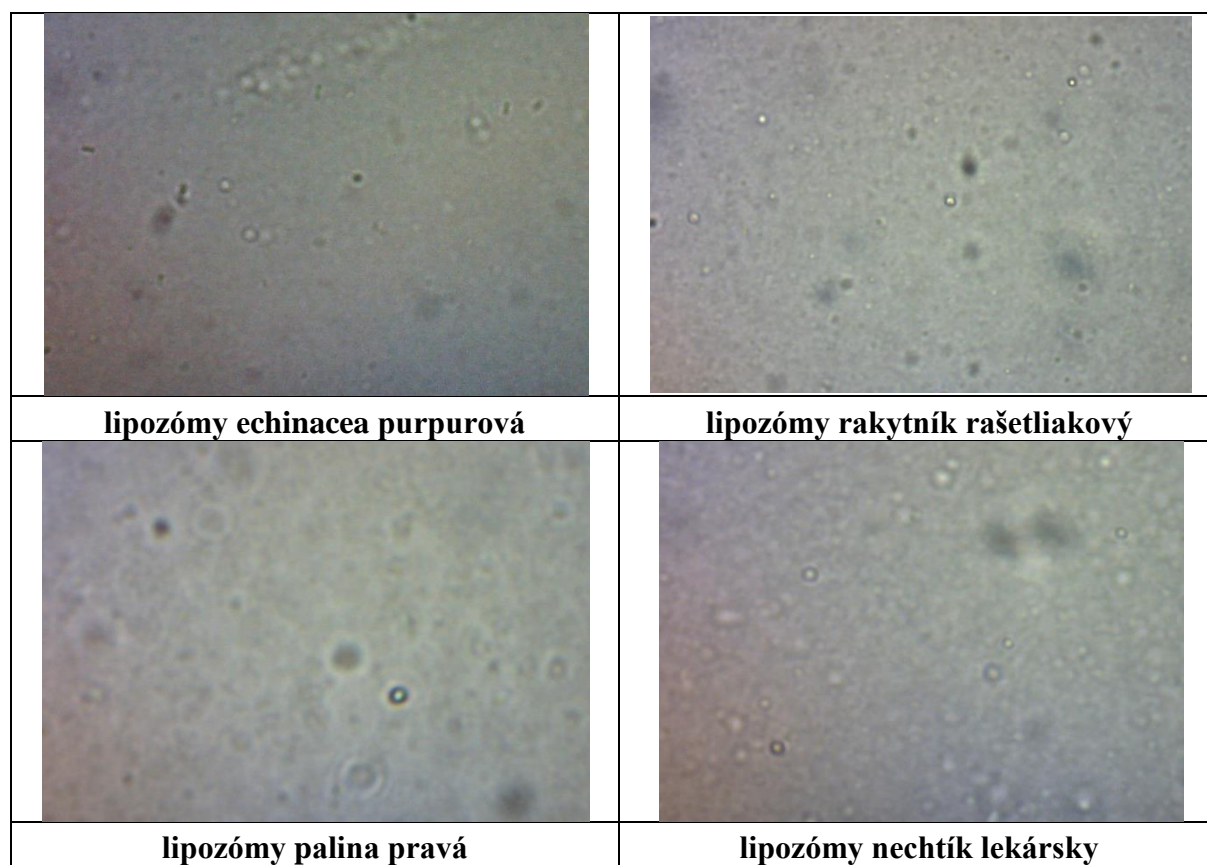


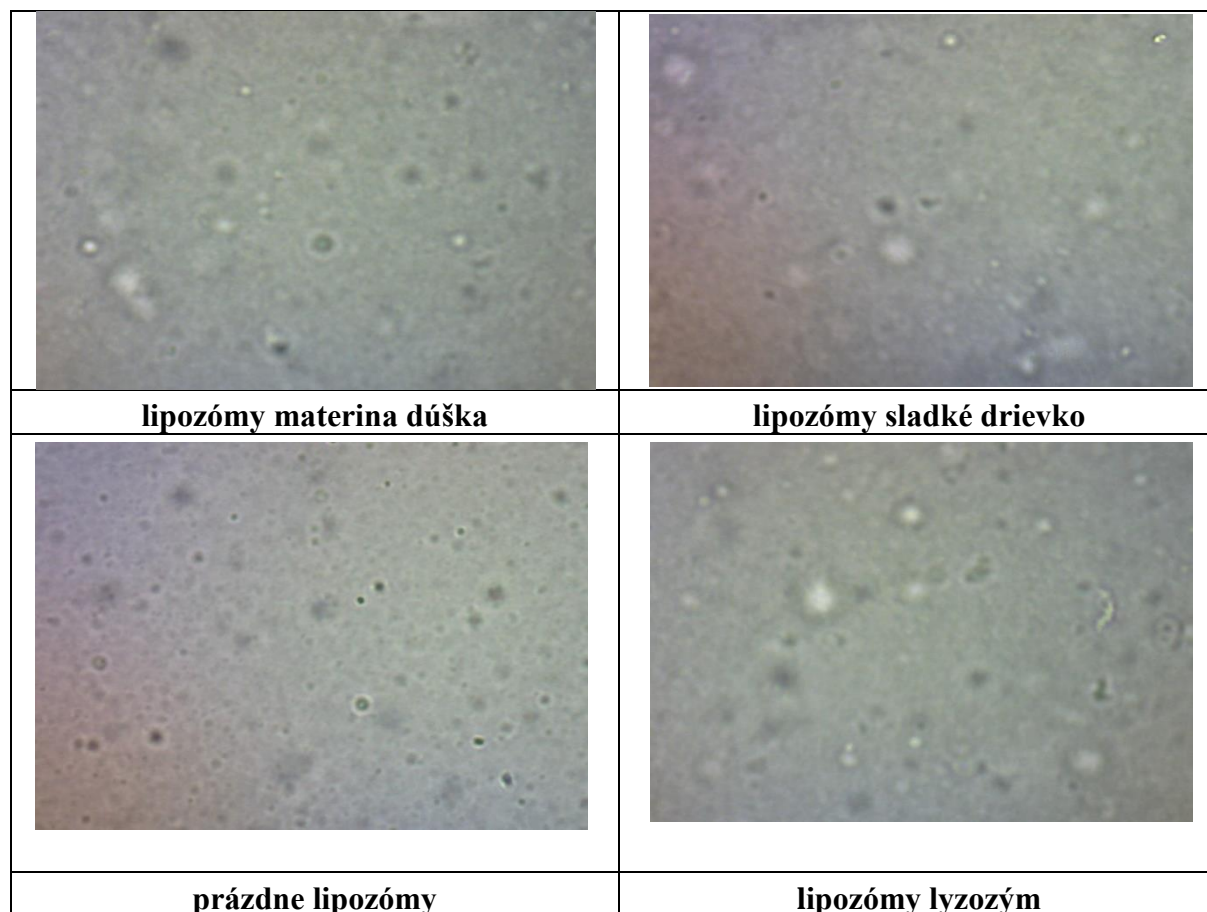
Obrázok 10: Enkapsulačná účinnosť bylinných extraktov

Z bylinných extraktov sa najlepšie enkapsuloval extrakt zo sladkého drierka a najnižšia enkapsulačná účinnosť bola stanovená pri lipozómoch z paliny pravej (Obr.10).

5.6 Vizualizácia častíc pomocou optického mikroskopu

Lipozómy s rôznymi enkapsulovanými zložkami boli vizualizované pomocou svetelného mikroskopu, pri zväčšení 640× (Obr.11).





Obrázok 11: Lipozomy (zväčšenie 640x)

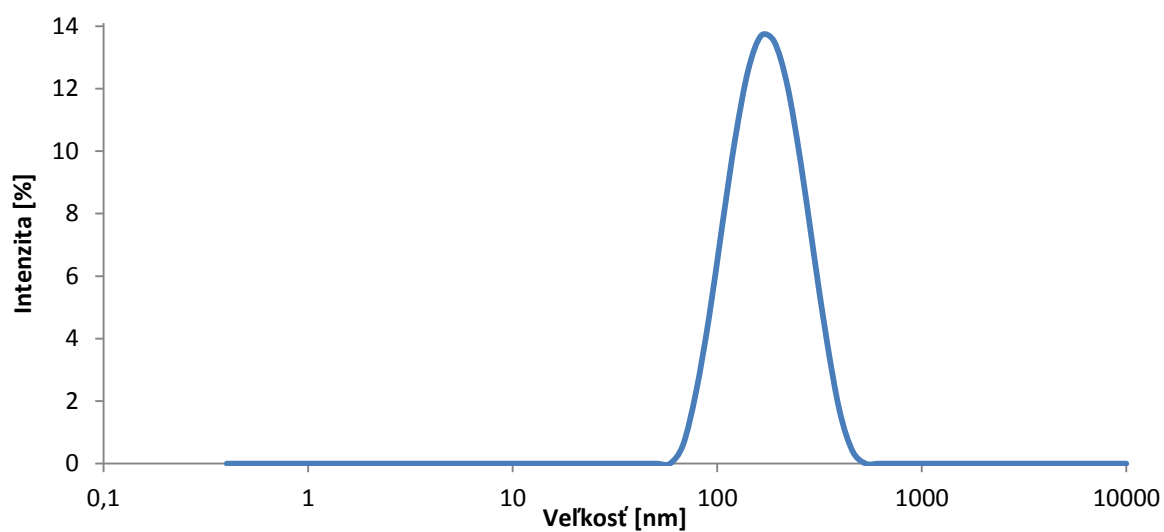
Z mikroskopického pozorovania lipozómov je zrejmé, že lipozomy s enkapsulovanou zložkou sú väčšie ako prázdne lipozomy (Obr.11).

5.7 Stanovenie veľkosti lipozómov

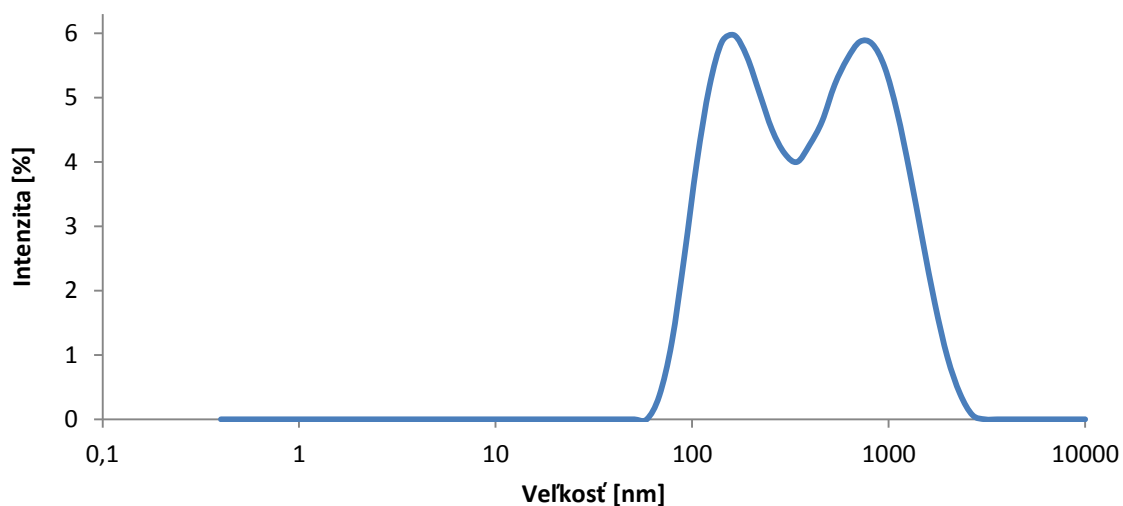
Vzorky lipozómov boli vhodne nariadené a následne bola stanovovaná ich veľkosť pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS metódou dynamického rozptylu svetla, tzv. DLS (Dynamic Light Scattering). Všetky merania boli vykonané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítané priemerné veľkosti lipozómov, ktoré sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 8.

Tabuľka 7: Priemerná veľkosť lipozómov s enkapsulovaným lyzozýmom a rastlinnými extraktmi

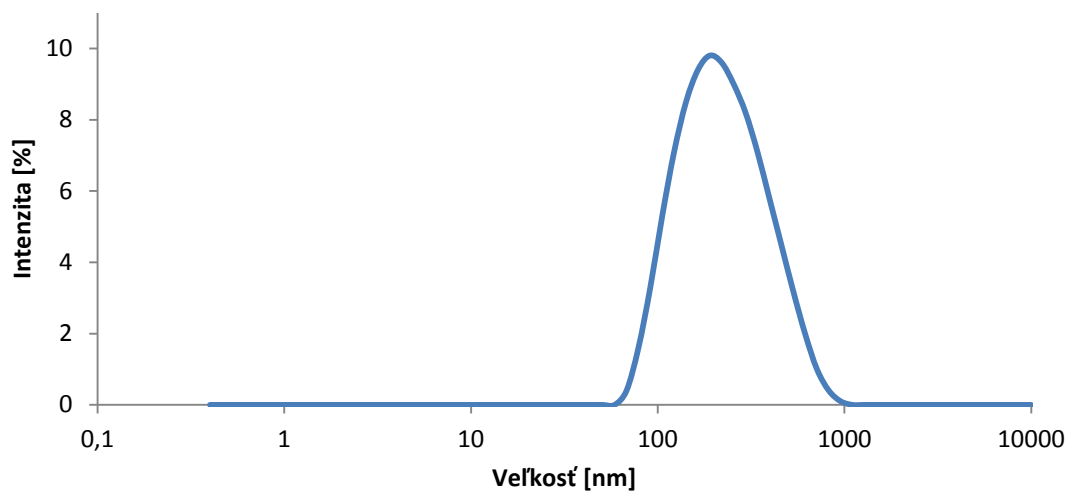
vzorka	ø veľkosť [nm]
lipozómy Palina pravá	215,9
lipozómy Materina dúška	219,1
lipozómy Echinacea koreň	167,0
lipozómy Sladké drievko	185,6
lipozómy Nechtík lekársky	204,3
lipozómy Rakytík rašetliakový	162,3
lipozómy prázdne	166,9
lipozómy lyzozým	280,8



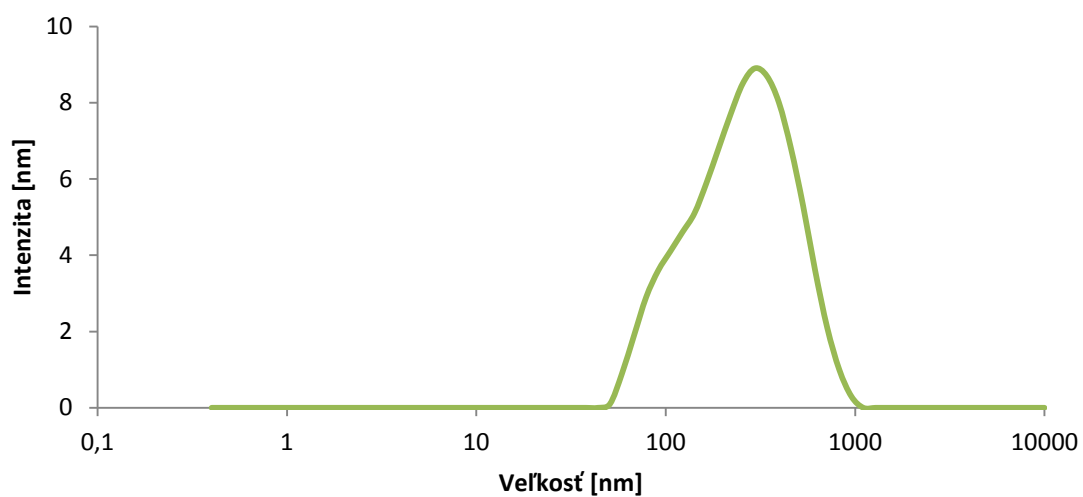
Obrázok 12: Veľkostná distribúcia prázdnych lipozómov



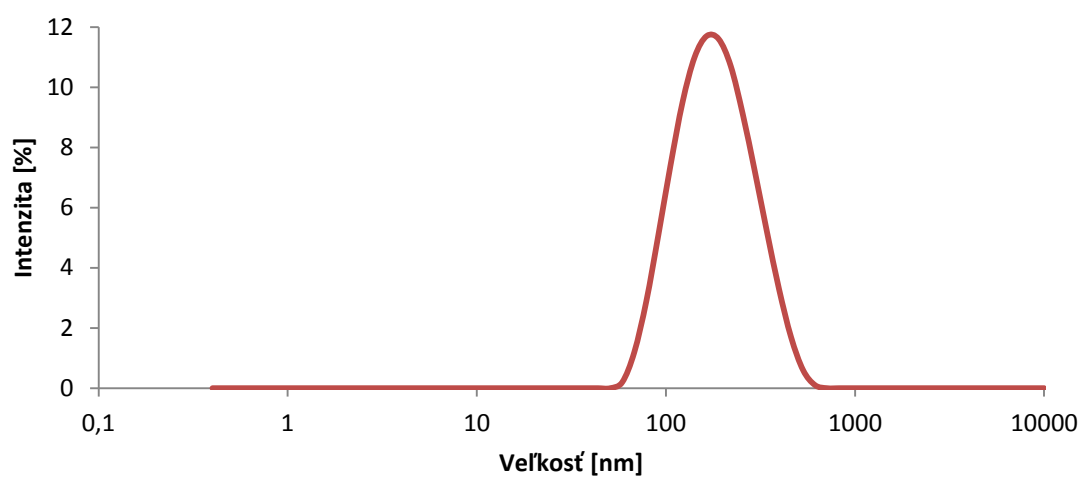
Obrázok 13: Veľkostná distribúcia lipozómov s lyzozýmom



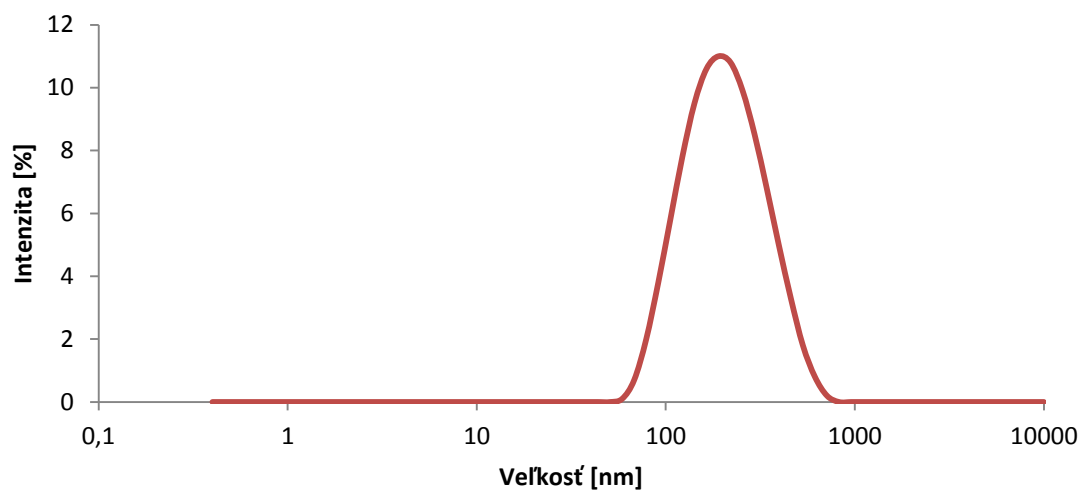
Obrázok 14: Veľkostná distribúcia lipozómov s extraktom z paliny pravej



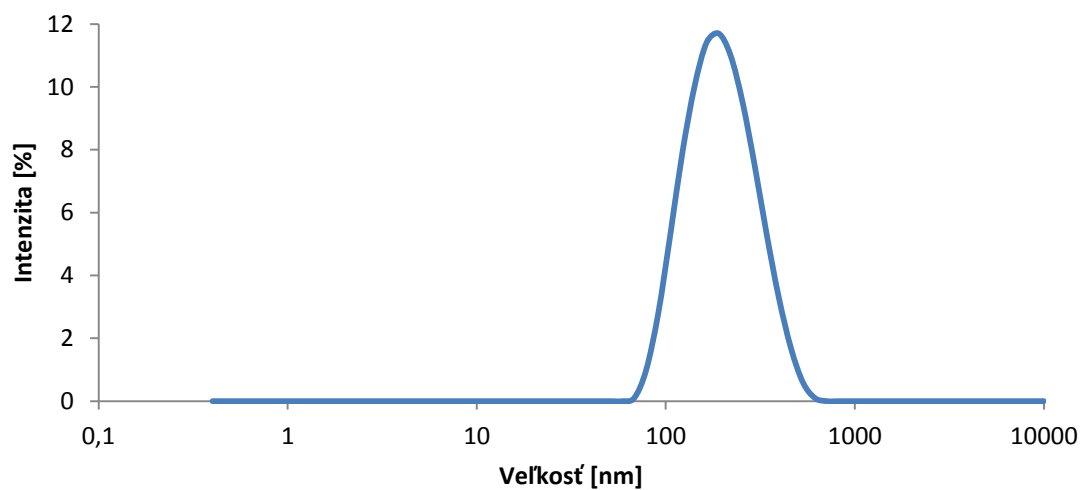
Obrázok 15: Veľkostná distribúcia lipozómov s extraktom z materskej dúšky



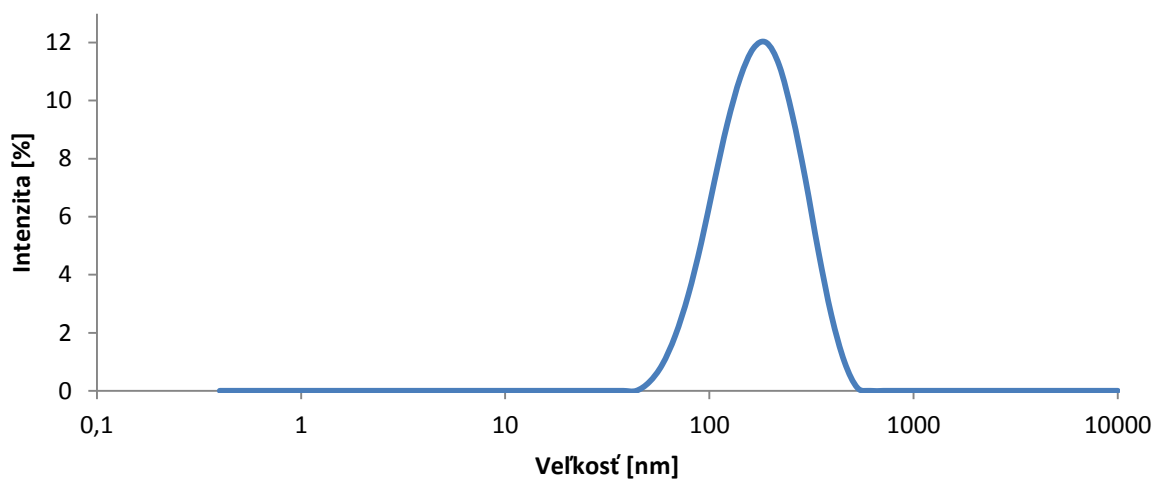
Obrázok 16: Veľkostná distribúcia lipozómov s extraktom z koreňa echinacey purpurovej



Obrázok 17: Veľkostná distribúcia častíc s extraktom zo sladkého drievka



Obrázok 18: Veľkostná distribúcia lipozómov s extraktom z nechtíka lekárskeho



Obrázok 19: Veľkostná distribúcia lipozómov s extraktom z rakytníka rašetliakového

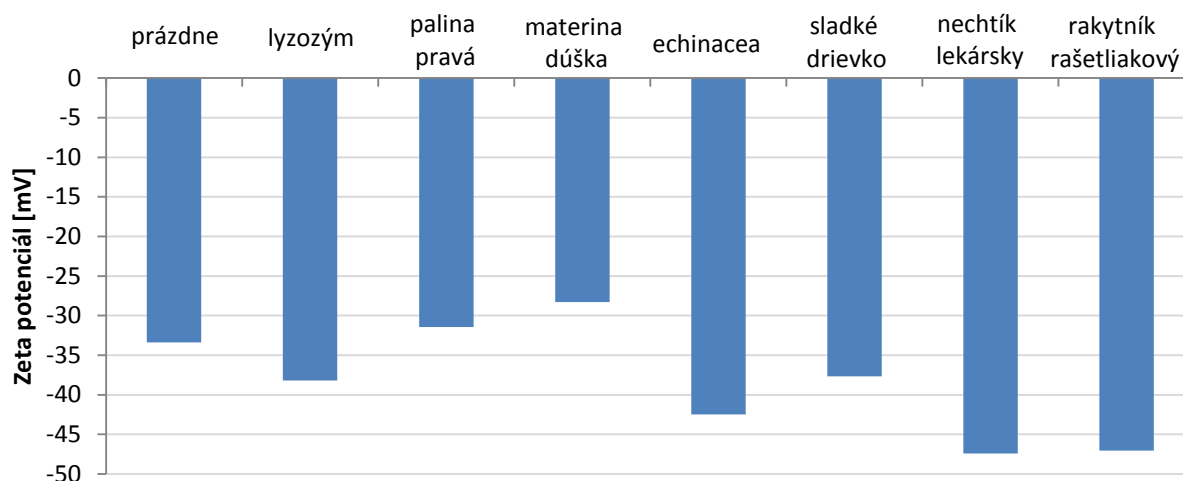
Z lipozómov s enkapsulovanými rastlinnými extraktmi mali najväčšiu veľkosť lipozómy s extraktom z materinej dúšky, ktorých veľkosť sa pohybovala v rozmedzí od 59 nm až do 1020 nm. O niečo menšie boli lipozómy s extraktom z paliny pravej, ktorých veľkosť sa pohybovala od 59 až do 956 nm. Veľkosť častíc s extraktom zo sladkého drievka sa pohybovala v rozmedzí od 44 až do 712 nm a veľkosť častíc s extraktom z koreňa echinacey purpurovej sa pohybovala v rozmedzí 59 až do 520 nm. Lipozómy s extraktom z rakytníka rašetliakového boli najmenšie, a ich veľkosť bola od 33 až do 459 nm. Veľkosť prázdnych lipozómov sa pohybovala v rozmedzí od 68 nm do 459 nm, pričom ich priemerná veľkosť bola 166,9 nm. Celkovo, najväčšie lipozómy boli zaznamenané pri lyzozýme, ktorých priemerná veľkosť bola 280,8 nm. Všeobecne, pri porovnaní s prázdnyimi časticami boli častice s bylinnými extraktmi aj lyzozýmom vplyvom enkapsulácie väčšie, až na lipozómy s extraktom rakytníka, ktorých priemerná veľkosť bola 162,3 nm (Obr.12-19).

5.8 Stabilita lipozómov

Vzorky pripravených častíc boli vhodne nariadené a pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments Ltd. bol meraný ich zeta potenciál, ktorý poskytuje informáciu o stabilite týchto častíc. Všetky merania boli uskutočnené trikrát a z nameraných hodnôt boli vypočítané priemerné hodnoty pre jednotlivé druhy lipozómov, ktorých hodnoty sú v nasledujúcej tabuľke 9.

Tabuľka 8: Zeta potenciály pripravených častíc

vzorka	σ zeta potenciál [mV]
lipozómy Palina pravá	-31,4
lipozómy Materina dúška	-28,3
lipozómy Echinacea koreň	-42,5
lipozómy Sladké drievko	-37,7
lipozómy Nechtík lekársky	-47,4
lipozómy Rakytlík rašetliakový	-47,0
lipozómy prázdne	-33,4
lipozómy lyzozým	-38,2



Obrázok 20: Zeta potenciály lipozómov s enkapsulovanými extraktmi

Zeta potenciál lipozómov s enkapsulovanými extraktmi sa vo väčšine prípadov nachádza za hranicou stability, t.j. -30 mV (Obr.17). Výnimku tvoria lipozómy s extraktom s materinou dúškou, ktorých zeta potenciál sa nachádza pod hranicu stability, konkrétne na hodnote -28,3 mV. V tejto oblasti, pod hranicou -30 mV, sú lipozómy nestabilné a dochádza ich zhlukovaniu do väčších celkov.

Všetky pripravené lipozómy okrem lipozómov s extraktom z materinej dúšky je tak možné považovať za stabilné. Najstabilnejšie sú lipozómy obsahujúce extraktnechtíka lekárskeho a rakytníka rašetliakového.

5.9 Dlhodobá stabilita enkapsulovaných zložiek do častíc

Dlhodobá stabilita enkapsulovaných látok bola stanovená podľa pracovného postupu uvedeného v kapitole 0.

Tabuľka 9: Dlhodobá stabilita lipozómov s lyzozýmom

Množstvo uvoľneného lyzozýmu z lipozómov	
po týždni	po mesiaci
1%	11,8%

Lipozómy vo vodnom prostredí, obsahujúce lyzozým, boli veľmi dobre stabilné. Po týždni sa z nich uvoľnilo len 1% z enkapsulovanej časti. Po mesiaci sa uvoľnilo necelých 12% enkapsulovaného lyzozýmu.

Tabuľka 10: Dlhodobá stabilita lipozómov s rastlinnými extraktmi

	množstvo uvoľnených polyfenolov z lipozómov (%)					
	Palina pravá	Materina dúška	Echinacea-koreň	Sladké drevko	Nechtík lekársky	Rakytník rašetliakový
po 3 týždňoch [mg/ml]	-18,5	-33,9	8,1	25,9	98,9	-50
Po 5 týždňoch [mg/ml]	-76,9	-7	35,1	53,7	62,7	21,4

V prípade lipozómov s extraktmi bylín, boli všetky pripravené lipozómy veľmi stabilné. Po týždni neboli zaznamenané žiadne uvoľnené polyfenoly (Tab.11).

Pri lipozómoch s extraktmi z echinacey, sladkého drievka a nechtíka bol po troch týždňoch zaznamenaný prírastok koncentrácie polyfenolov v roztoku, ktorý mohol byť spôsobený ich uvoľnením z častíc, čiže uvoľnenie z lipozómov prevláda nad ich degradáciou. V prípade paliny pravej je trend opačný, obsah polyfenolov v roztoku sa znižuje, čo môže byť pripísané ich degradácii, ktorá výrazne prevláda nad ich uvoľňovaním. Najviac polyfenolov sa uvoľnilo práve z lipozómov s extraktom z nechtíka, kde došlo k uvoľneniu takmer všetkého enkapsulovaného množstva.

Po piatich týždňoch došlo k ďalšiemu uvoľneniu polyfenolov len z lipozómov s extraktom z echinacey a sladkého drievka, pri ktorom sa uvoľnilo viac ako polovica enkapsulovaného množstva (53,7%). Pri nechtíku došlo k relatívne výraznej degradácii voľných polyfenolov. Záporná hodnota v tabuľke vyjadruje, že obsah jednotlivých látok je menší, ako hodnota nameraná v čase 0. Toto mohlo byť spôsobené napríklad degradáciou polyfenolov vo voľnom roztoku.

5.10 Antimikrobiálne testy

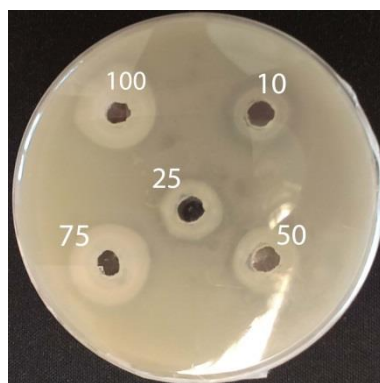
Antimikrobiálne účinky extraktov boli testované na spomenutých štyroch druhoch baktérií (4.7). Extrakty bylín boli pripravené rovnakým spôsobom ako pri stanovovaní celkových polyfenolov a flavonoidov (4.2.3, 4.2.2), pričom boli desaťkrát koncentrovanejšie, t.j. 10 g bylinky/10 ml vody.

5.10.1 Test na pevnom médiu

V tomto teste boli do pevného média s naočkovaným mikroorganizmom vyhlbené jamky, do ktorých bol napipetovaný príslušný bylinný extrakt a roztok lyzozýmu. Po inkubácii bol odčítaný priemer vytvorených inhibičných zón (Tab.12). Presný postup tejto metódy je uvedený v kapitole 4.7.2.

Tabuľka 11: Inhibičné zóny pre lyzozým

Koncentrácia lyzozýmu [mg/ml]	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>
	priemer inhibičnej zóny [mm]			
10	1,5	4,5	6,0	6,0
25	2,5	5,5	7,5	7,0
50	3,3	7,0	8,5	8,0
75	4,0	9,5	9,7	10,0
100	5,0	11,0	11,0	12,0



Obrázok 21: Lyzozým, koncentrácie 10-100 mg/ml -inhibičné zóny - *Bacillus subtilis*

Lyzozým mal účinok voči všetkým testovaným typom baktérií, pričom najvyššiu aktivitu vykazoval voči *M. luteus* a najnižšiu voči *E. coli*.

Tabuľka 12: Inhibičné zóny pre bylinné extrakty

extrakty	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>
	priemer inhibičnej zóny [mm]			
Palina pravá	3,5	5,5	3,5	6,5
Materina dúška	3,0	4,5	1,5	4,0
Echinacea-koreň	8,5	4,8	3,0	7,0
Sladké drievko	5,0	5,0	3,5	7,5
Nechtík lekársky	6,0	1,5	2,5	6,5
Rakytník rašetliakový	3,0	2,5	1,5	6,5

Najväčší priemer inhibičnej zóny pri testovaní na *E. coli* bol zaznamenaný pri použití extraktu z koreňa echinacey, kedy inhibičná zóna merala v priemere 8,5 mm, a naopak, najmenší účinok na tento typ baktérie mal extrakt z rakytníka, pri ktorom bol priemer inhibičnej zóny len 3 mm (Tab.13). Pri baktérii *S. marcescens* mal najvyšší účinok extrakt z paliny pravej, pri ktorom merala inhibičná zóna 5,5 mm, pričom najmenej účinný bol extrakt z nechtíka lekárskeho, pri ktorom merala inhibičná zóna 1,5 mm. Najmenej účinné extrakty pri testovaní na *B. subtilis*, boli extrakty z materinej dúšky a rakytníka, pri ktorých inhibičné zóny merali rovnako, 1,5 mm. Naopak, ako najviac účinné sa preukázali extrakty z paliny pravej a sladkého drievka, ktorých inhibičné zóny tiež merali zhodne, a to 3,5 mm. Voči *M. luteus* bol najúčinnnejší extrakt zo sladkého drievka, pri ktorom inhibičná zóna merala 7,5 mm. Najmenej účinný bol extrakt z materinej dúšky, pri ktorom bol priemer vytvorenej inhibičnej zóny len 4 mm.

Pri celkovom porovnaní sa ako najúčinnnejší extrakt voči týmto testovacím baktériám javí extrakt z koreňa echinacey a sladkého drievka. Najnižší účinok bol zaznamenaný pri pôsobení extraktu z materinej dúšky a rakytníka.

5.10.2 Stanovenie koncentrácie a viability buniek prietokovou cytometriou

Pred samotným testovaním antimikrobiálnej aktivity použitých extraktov a lyzozýmu bola pri jednotlivých mikroorganizmoch stanovená ich viabilita a koncentrácia pomocou prietokového cytometra. Postup, podľa ktorého sa postupovalo je v kapitole 5.10.2.

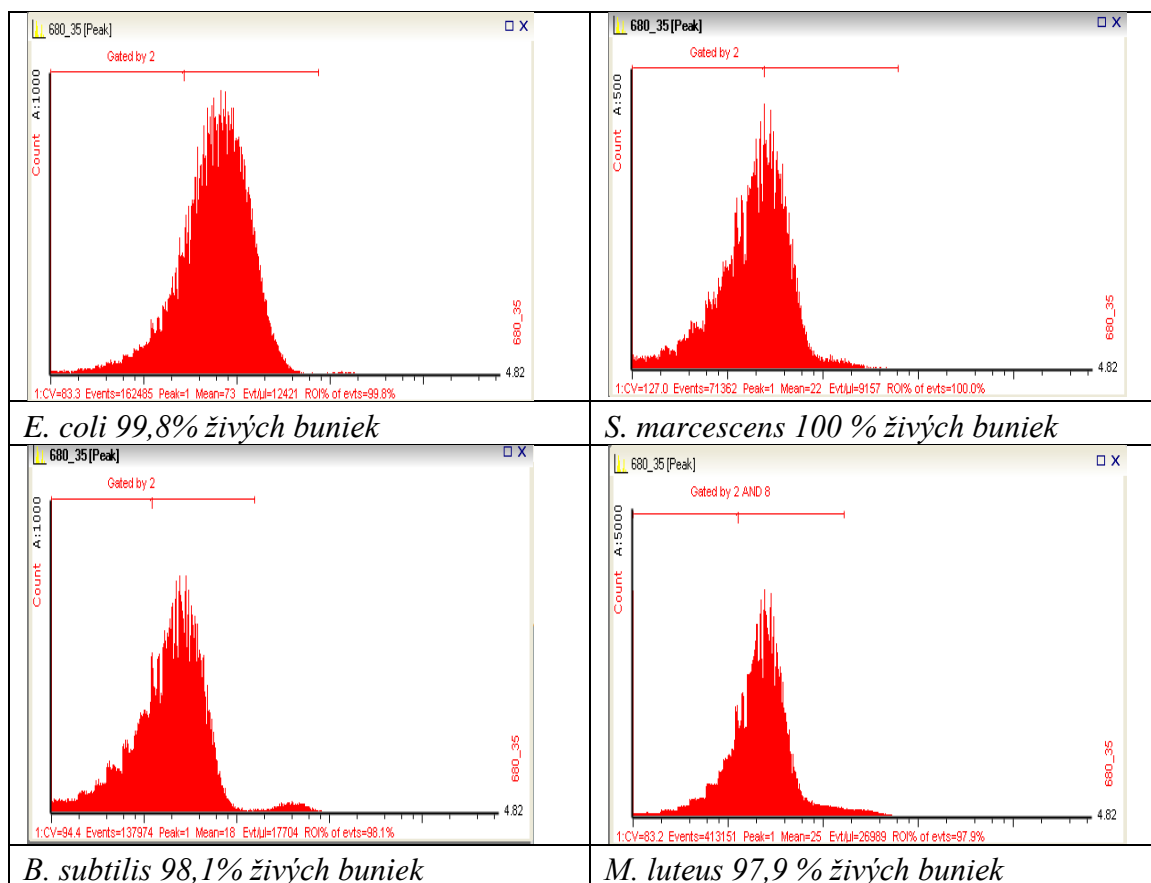
Pre všetky testované kmene použitých baktérií boli zostavené kalibračné závislosti počtu buniek na absorbancii, ktoré sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 14.

Tabuľka 13: Kalibračné závislosti počtu buniek na absorbancii

<i>E. coli</i>	$y = 0,0000036x$
<i>S. marcescens</i>	$y = 0,0000026x$
<i>M. luteus</i>	$y = 0,0000060x$
<i>B. subtilis</i>	$y = 0,0000011x$

Tieto kalibračné krivky boli použité pri prepočte absorbancie na počet buniek v médiu pri antimikrobiálnom teste na mikrotitračných doštičkách.

Viabilita všetkých buniek bola testovaná na 24 hodinovom inokule, ktoré bolo použité pri testoch antimikrobiálnej aktivity.



Obrázok 18: stanovenie viability buniek pomocou prietokovej cytometrie

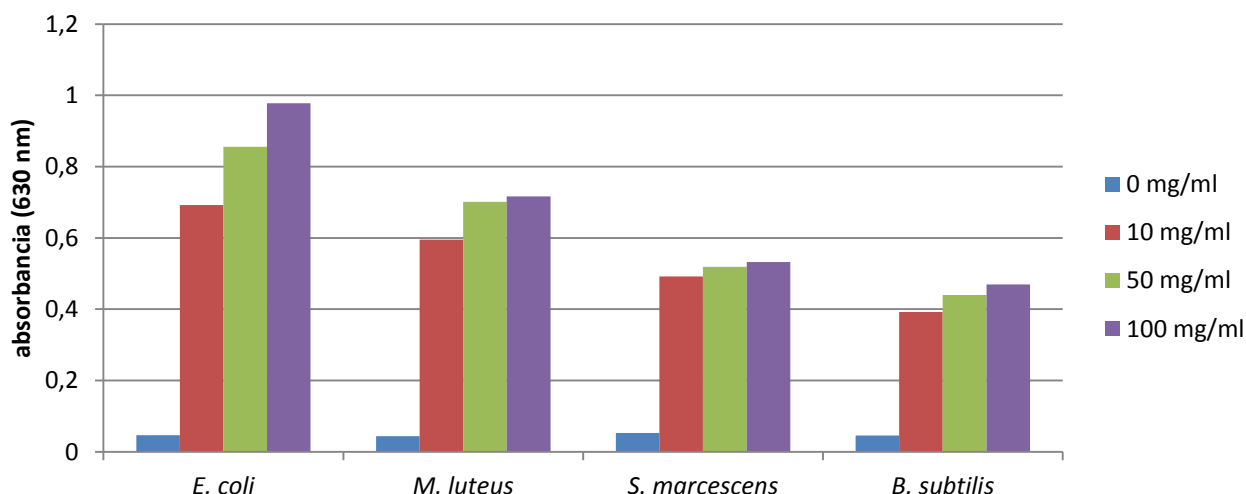
Pri gramnegatívnych kmeňoch *E. coli* a *S. marcescens* boli po 24 hodinách kultivácie detegované len živé bunky. Pri rovnako starých kultúrach grampozitívnych kmeňoch *B. subtilis* a *M. luteus* boli detegované približne 2% mŕtvych buniek.

5.10.3 Test na mikrotitračných doštičkách

Pri stanovení antimikrobiálnej aktivity prostredníctvom zákalu bolo postupované podľa postupu uvedeného v kapitole 4.7.3. Pri testovaní účinkov lyzozýmu bol, v prípade 24 -

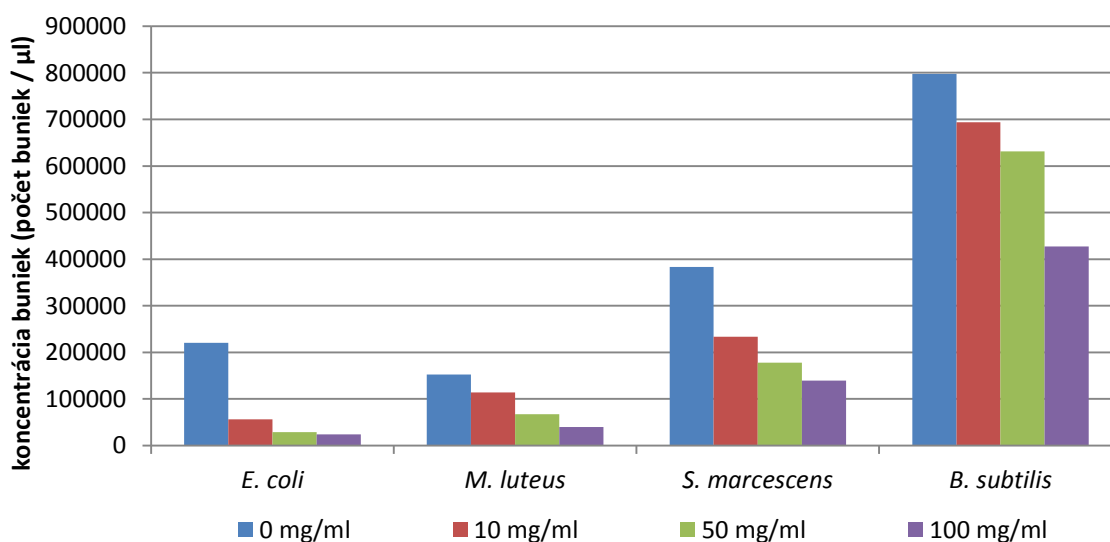
hodinového inokula, po 5 minútach sledovaný zákal spôsobený rozpadom buniek vplyvom antimikrobiálneho pôsobenia. V prípade testovania bylinných extraktov bola, pri čerstvo zaočkovaných médiách, sledovaná inhibícia rastu mikroorganizmov v čase 0, v 3 a 24 hodinách.

5.10.3.1 Antimikrobiálne účinky lyzozýmu



Obrázok 22: Pôsobenie lyzozýmu v čase 5 minút

Zákal, vzniknutý rozpadom buniek, bol sledovaný po 5 minútach od pridania roztoku lyzozýmu. Výsledný zákal bol porovnaný s hodnotou blanku. Čím väčší bol výsledný zákal, oproti vzorke bez prídavku lyzozýmu, tým viac buniek sa rozpadlo. Pri všetkých testovaných vzorkách bol zaznamenaný výrazný antimikrobiálny účinok (Obr.22).

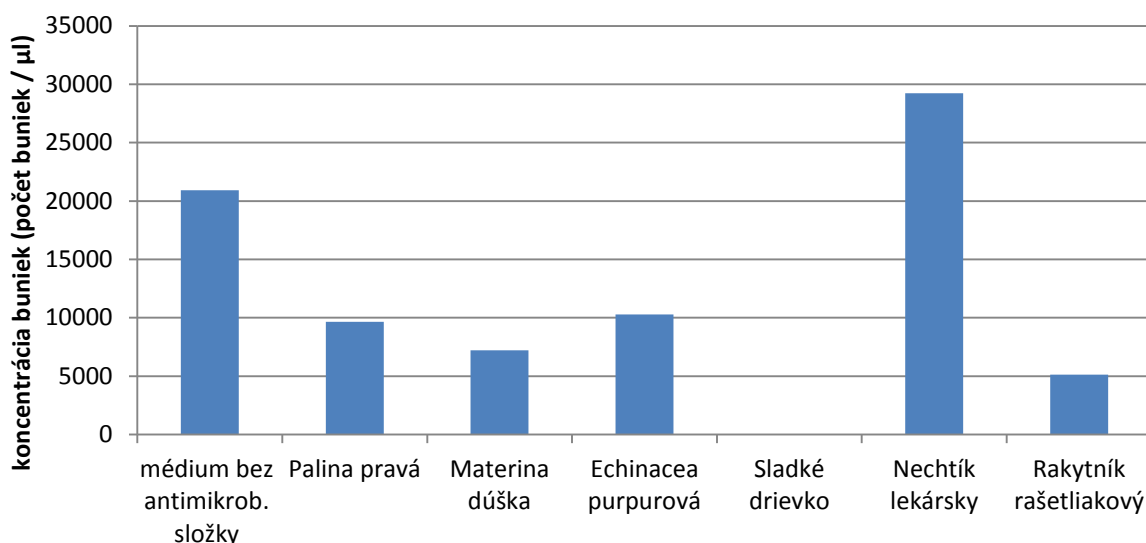


Obrázok 23: Pôsobenie lyzozýmu v čase 24 hodín

Po 24 hodinách inkubácie mikrotitračných doštičiek, bola najvyššia antimikrobiálna aktivita zaznamenaná pri roztoku lyzozýmu s koncentráciou 100 mg/ml. Lyzozým má antimikrobiálny účinok na obe skupiny mikroorganizmov, na grampozitívne aj gramnegatívne

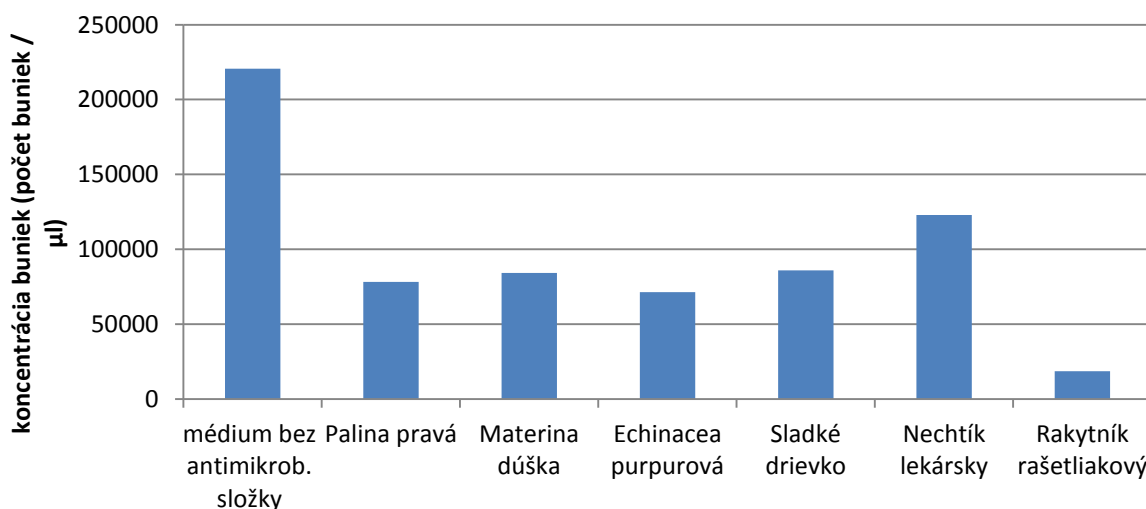
baktérie. Najväčší účinok lyzozýmu bol pozorovaný pri *E. coli* a *M. luteus* a naopak, najmenší účinok mal lyzozým na *B. subtilis*.

5.10.3.2 Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň *E. coli*



Obrázok 24: Pôsobenie extraktov na *E. coli* v čase 3 hodiny

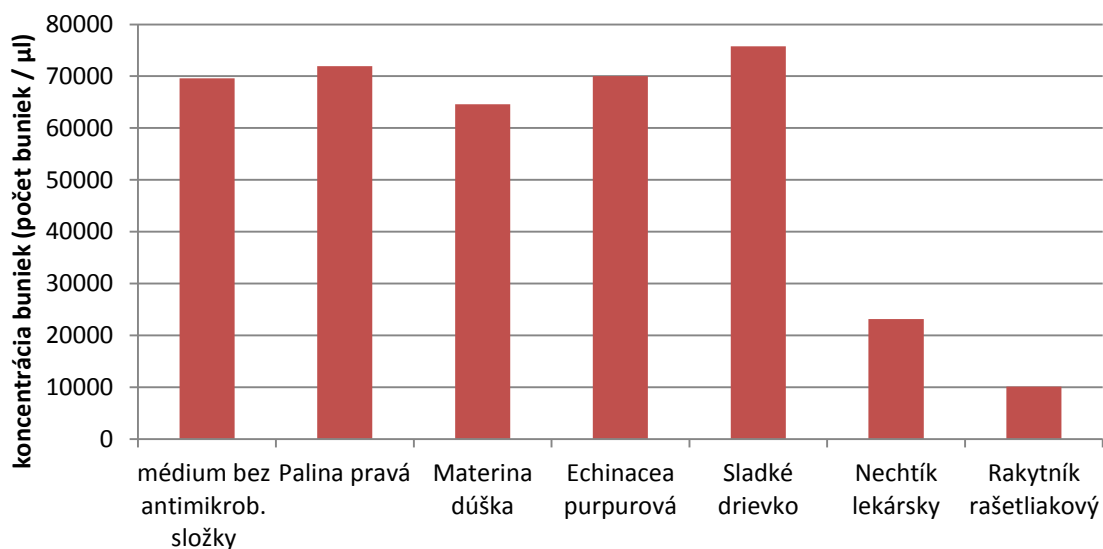
Pri testovaní na *E. coli* sa po 3 hodinách inkubácie prejavili u všetkých použitých extraktoch antimikrobiálne účinky (Obr.24). Výnimkou bol extrakt z nechtíka lekárskeho. Najvyšší antimikrobiálny účinok prejavoval extrakt zo sladkého drevka, pri ktorom nebol pozorovaný nárast buniek.



Obrázok 25: Pôsobenie extraktov na *E. coli* v čase 24 hodín

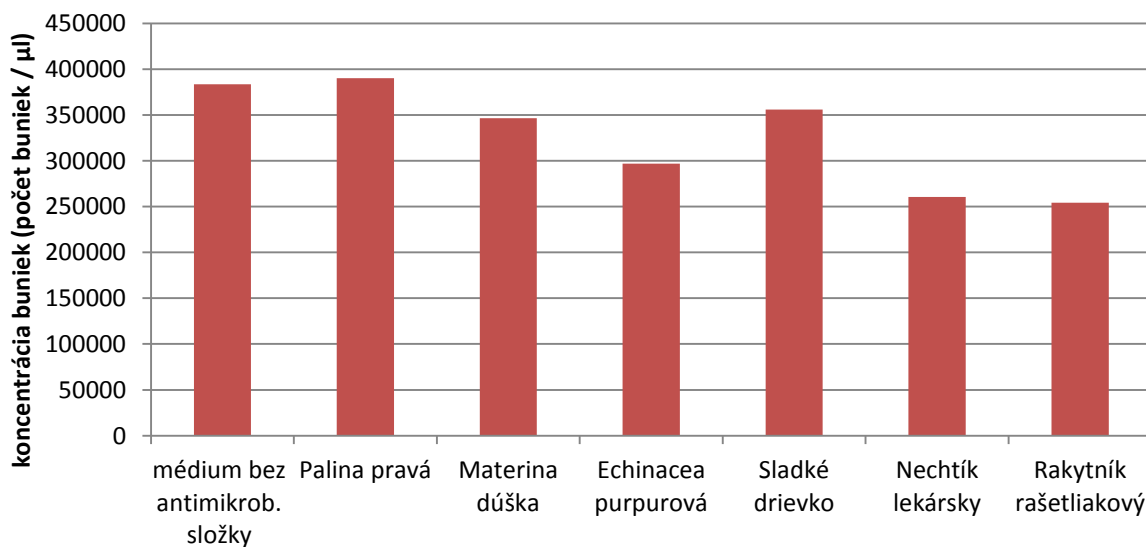
Po 24 hodinách inkubácie bol antimikrobiálny účinok pozorovaný pri všetkých použitých extraktoch. Najúčinnnejšie pôsobil extrakt z rakytníka rašetliakového a naopak, najmenší účinok bol zaznamenaný pri extrakte z nechtíka lekárskeho (Obr.25).

5.10.3.3 Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň *S. marcescens*



Obrázok 26: Pôsobenie extraktov na *S. marcescens* v čase 3 hodiny

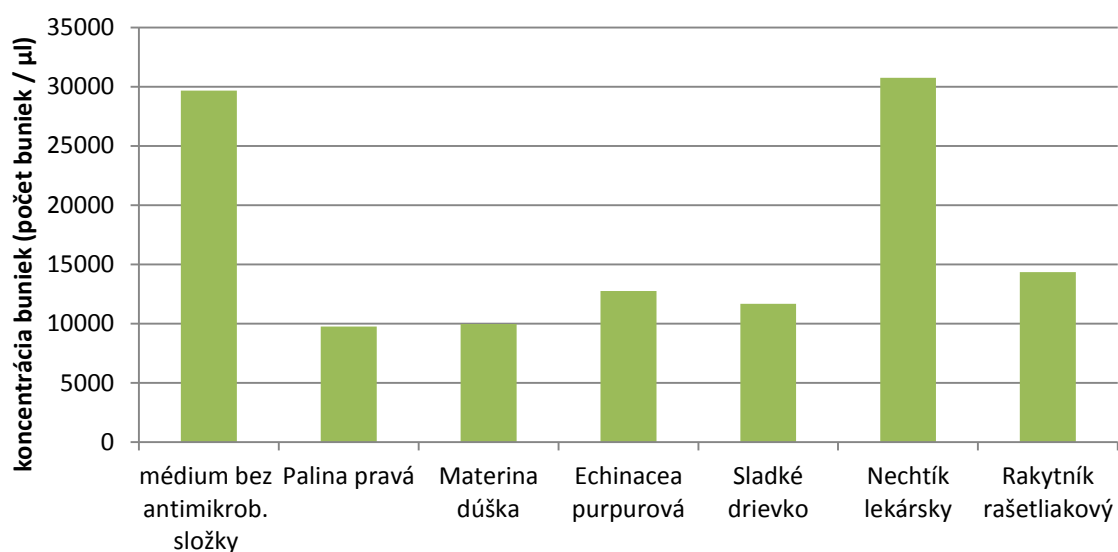
Po 3 hodinách inkubácie sa ako najúčinnnejšie voči *S. marcescens* previli extrakty z nechtíka lekárskeho a rakytníka rašetliakového, ktorý mal spomedzi testovaných extraktov najvyšší antimikrobiálny účinok (Obr.26). Minimálny účinok vykazoval extrakt z materinej dúšky. Pri ostatných extraktoch nebol antimikrobiálny účinok zaznamenaný.



Obrázok 27: Pôsobenie extraktov na *S. marcescens* v čase 24 hodín

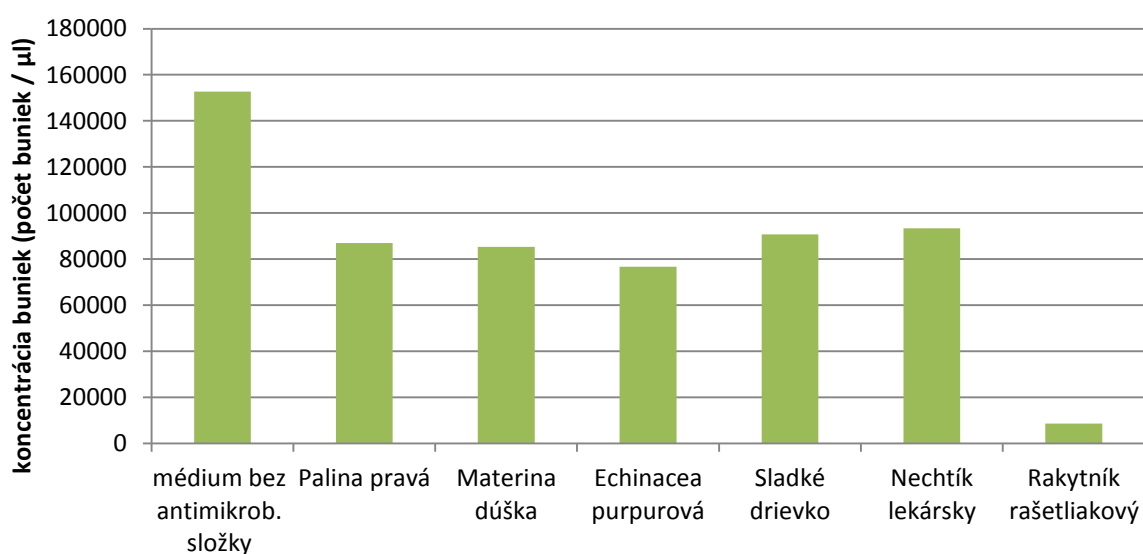
Po 24 hodinách inkubácie vykazovali najväčší antimikrobiálny účinok opäť extrakty z nechtíka lekárskeho a rakytníka rašetliakového (Obr.27). Oproti testovaniu po 3 hodinách, vykazoval minimálny účinok okrem extraktu z materinej dúšky aj extrakt z koreňa echinacey purpureovej a sladkého drevka. Extrakt z paliny pravej sa neprejavil antimikrobiálne.

5.10.3.4 Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň *M. luteus*



Obrázok 28: Pôsobenie extraktov na *M. luteus* v čase 3 hodiny

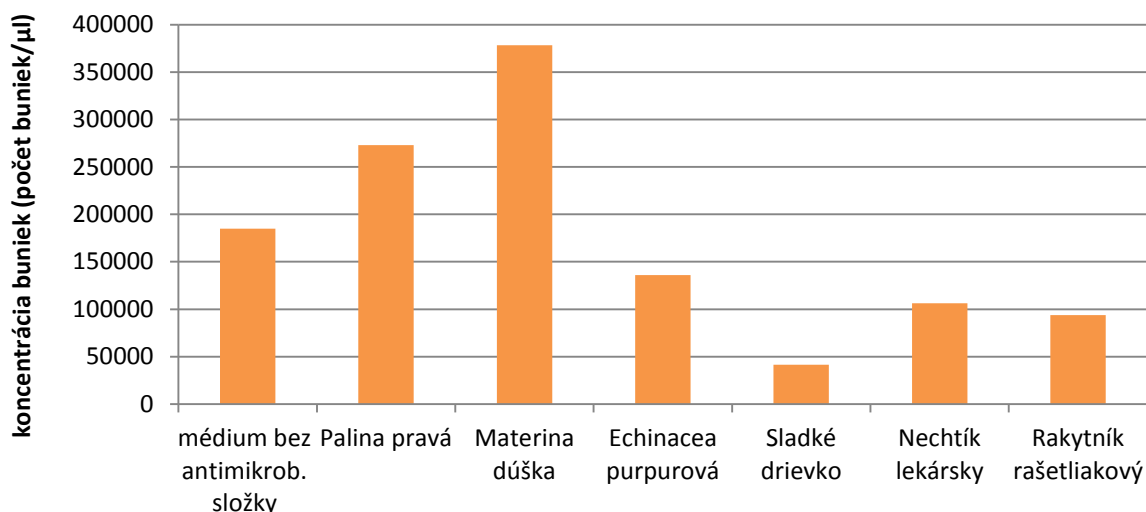
Po 3 hodinách inkubácie sa pri *M. luteus* prejavili všetky bylinné extrakty, okrem extraktu z nechtíka lekárskeho, antimikrobiálne. Najvyšší účinok bol pozorovaný pri extrakte z materej dúšky a paliny pravej (Obr.28).



Obrázok 29: Pôsobenie extraktov na *M. luteus* v čase 24 hodín

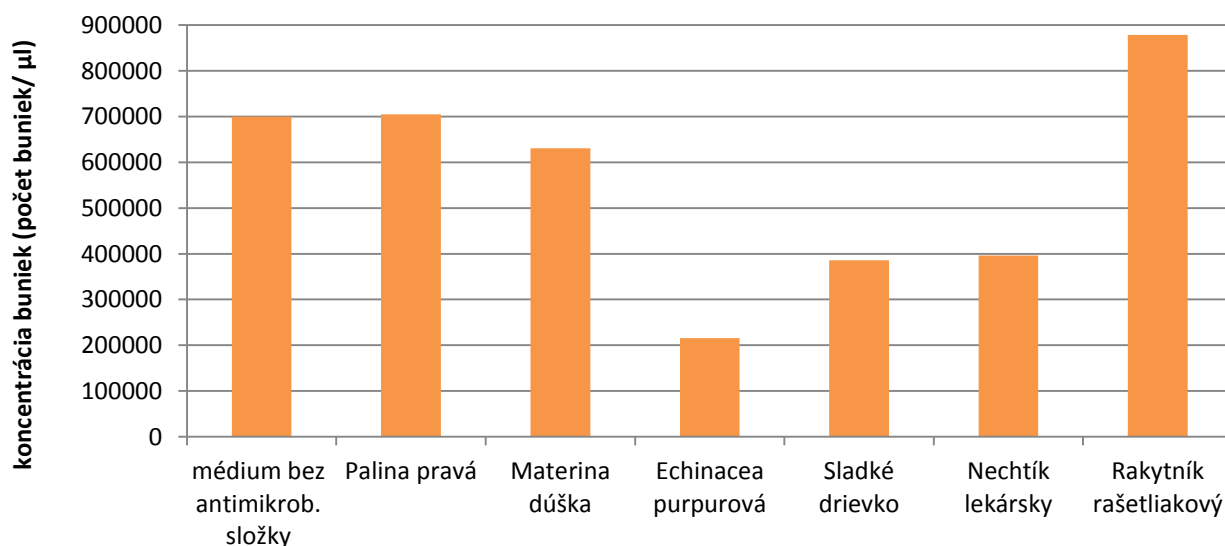
Po 24 hodinách inkubácie bol antimikrobiálny účinok pozorovaný pri všetkých použitých extraktoch (Obr.29). Najúčinnjší bol extrakt z rakytníka rašetliakového. Najmenší antimikrobiálny účinok bol zaznamenaný pri extrakte z nechtíka lekárskeho, pričom účinok ostatných extraktov bol s ním porovnateľný.

5.10.3.5 Antimikrobiálne účinky vybraných bylinných extraktov na kmeň *B. subtilis*



Obrázok 30: Pôsobenie extraktov na *B. subtilis* v čase 3 hodiny

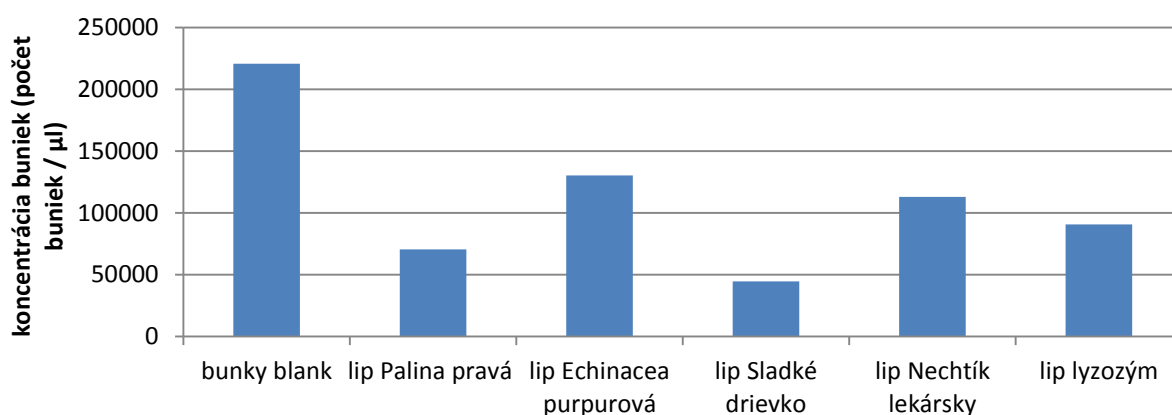
Po 3 hodinách inkubácie pri *B. subtilis*, bola najvyššia antimikrobiálna účinnosť zaznamenaná pri extrakte zo sladkého drevka (Obr.30). Naopak, žiadny antimikrobiálny účinok nevykazoval extrakt z paliny pravej a materinej dúšky, pri ktorom bol dokonca zaznamenaný výrazný rast buniek oproti médiu bez antimikrobiálnej zložky, čo je možné vidieť na Obr.30, pri porovnaní prvého s druhým a tretím stĺpcom.



Obrázok 31: Pôsobenie extraktov na *B. subtilis* v čase 24 hodín

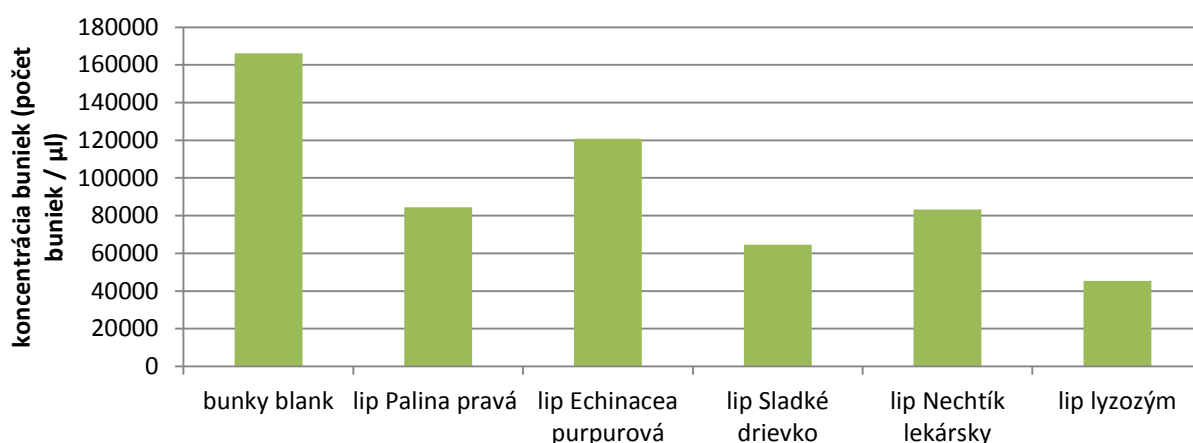
Po 24 hodinách kultivácie sa prejavili antimikrobiálne účinky extraktov z materinej dúšky, nechtíka lekárskeho, sladkého drevka a koreňa echinacey purpurovej, pričom najúčinnšie pôsobil práve posledný spomínaný extrakt (Obr.31). Žiadny antimikrobiálny účinok nevykazoval extrakt z rakytníka rašetliakového a paliny pravej.

5.10.3.6 Antimikrobiálne účinky lipozómov s enkapsulovanými extraktmi



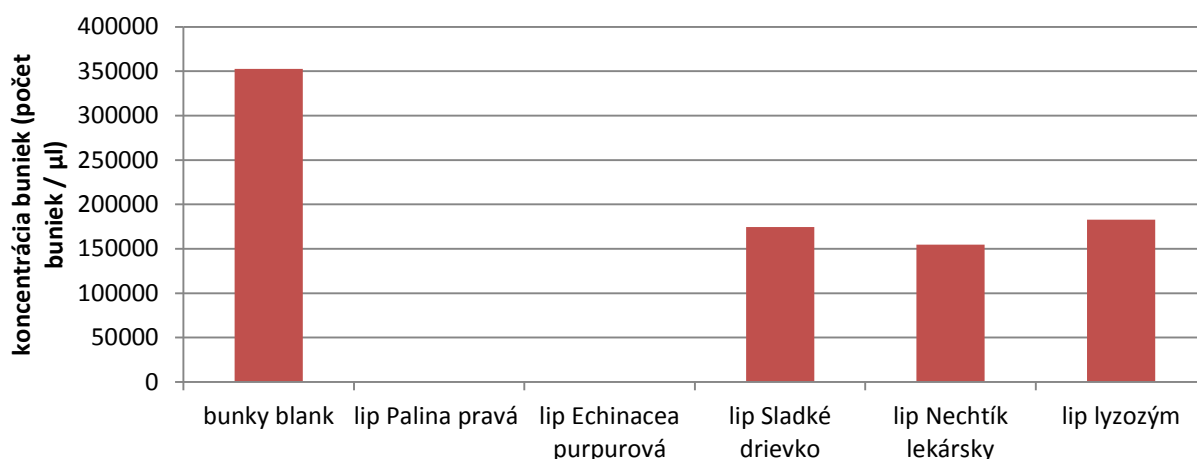
Obrázok 32: Pôsobenie lipozómov na *E. coli*

Po 24 hodinách inkubácie sa pri testovaní na *E. coli* prejavili všetky lipozómy s extraktmi ako antimikrobiálne (Obr.32). Najvyšší antimikrobiálny účinok mali lipozómy s extraktom zo sladkého drevka, pričom spolu s lipozómami s extraktom z paliny pravej boli účinnejšie ako lipozómy s lyzozýmom. Naopak, najmenej účinné boli lipozómy s extraktmi z echinacey purpurovej a nechtíka lekárskeho.



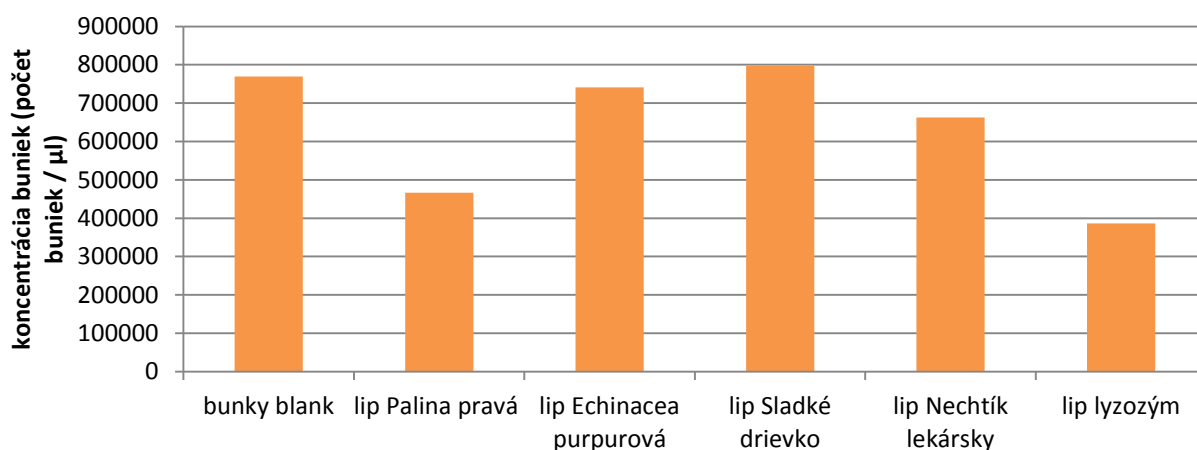
Obrázok 33: Pôsobenie lipozómov na *M. luteus*

Po 24 hodinách inkubácie sa pri baktérii *M. luteus* prejavili všetky testované lipozómy ako antimikrobiálne (Obr.33). Najvyšší účinok bol pozorovaný pri lipozómoch s lyzozýmom a extraktom zo sladkého drevka. Najmenší účinok mali lipozómy s extraktom z echinacey purpurovej.



Obrázok 34: Pôsobenie lipozómov na *S. marcescens*

Po 24 hodinách inkubácie vykazovali všetky pripravené lipozómy voči *S. marcescens* antimikrobiálny účinok (Obr.34). Najúčinnnejšie pôsobili lipozómy s extraktmi z paliny pravej a echinacey purpurovej, pri ktorých nebol zaznamenaný žiadny rast buniek. Najmenej účinné boli lipozómy s lyzozýmom a s extraktom zo sladkého drevka, ktorých antimikrobiálny účinok bol porovnateľný aj s lipozómami s extraktom z nechtíka lekárskeho.



Obrázok 35: Pôsobenie lipozómov na *B. subtilis*

Antimikrobiálne účinky voči *B. subtilis* po 24 hodinách kultivácie sa prejavili pri všetkých pripravených lipozómoch okrem lipozómov s extraktom zo sladkého drevka a echinacey purpurovej, pri ktorých bol účinok iba minimálny (Obr.35). Najvyšší účinok mali lipozómy s lyzozýmom a s extraktom z paliny pravej.

Pri porovnaní výsledkov testov sa ako najúčinnnejší, voči testovaným bakteriálnym kmeňom, preukázal extrakt z koreňa echinacey purpurovej. Najvyšší účinok, pri pôsobení extraktov enkapsulovaných v lipozómoch, bol zaznamenaný pri extraktoch z echinacey purpurovej, paliny pravej a sladkého drevka. Antimikrobiálny účinok lyzozýmu voči baktériám sa prejavil zvýšeným zákalom veľmi rýchlo, a to už pár sekúnd po pridaní k bakteriálnej kultúre. Enkapsulačná účinnosť lyzozýmu bola veľmi vysoká, 91,9% a tieto lipozómy boli vo vodnom prostredí stabilné, kedy sa po mesiaci uvoľnilo len 11,8% enkapsulovaného množstva.

Lysozým by mohol byť súčasťou gélu s antimikrobiálnymi vlastnosťami, pri ktorom by zabezpečoval okamžitý antimikrobiálny účinok voči baktériám. Súčasťou tohto gélu by mohol byť aj voľný extrakt z rakytníka rašetliakového, ktorý vykazoval vysoký inhibičný účinok voči rozmnožovaniu baktérií pri troch zo štyroch testovaných kmeňoch. Pridaním extraktu z echinacey a sladkého drievka by mohol byť posilnený antimikrobiálny účinok voči širšiemu spektru baktérií, pričom časť týchto extraktov by mohla byť, vzhľadom na dobrú enkapsulačnú účinnosť a aj stabilitu častíc, uzavretá v lipozómoch. Navyše, extrakt z echinacey by vysokým obsahom antioxidačnej aktivity mohol aj priaznivo pôsobiť pri regenerácii postihnutého miesta.

6 ZÁVER

Táto práca sa zaoberá štúdiom antimikrobiálnych vlastností extraktov z paliny pravej (*Artemisia absinthium*), materinej dúšky (*Thymus serpyllum*), koreňa echinacey purpurovej (*Echinacea purpurea*), sladovky hladkoplodej (sladkého drierka) (*Glycyrrhiza glabra*), nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis*), rakytníka rašetliakového (*Hippophae rhamnoides*) a enkapsuláciou týchto extraktov a lyzozýmu, enzýmu s významným antimikrobiálnym účinkom, do lipozómov.

V teoretickej časti bola spracovaná stručná rešerš, zahŕňajúca charakterizáciu antimikrobiálnych látok, antioxidantov a ich obsah v použitých a opísaných bylinkách. Následne boli popísané aj testovacie kmene a jednotlivé postupy analýzy vybraných aktívnych látok vo výtlačkoch bylín a metód stanovenia citlivosti mikrobiálnych kmeňov voči použitým extraktom.

V praktickej časti bola pri jednotlivých extraktoch stanovená ich koncentrácia polyfenolov, flavonoidov a rovnako aj antioxidačná účinnosť. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazoval extrakt z echinacey, pričom najvyšší obsah polyfenolov a flavonoidov obsahoval extrakt z materinej dúšky.

Lyzozým aj extrakty boli podrobené enkapsulácii do lipozómov s použitím ultrazvuku. Najlepšie sa enkapsuloval lyzozým, ktorého enkapsulačná účinnosť dosiahla 91,9%. Z bylinných extraktov bola najvyššia enkapsulačná účinnosť zaznamenaná pri sladkom drierku, ktorá dosiahla účinnosť 60,2%. Naopak, najmenšia účinnosť bola stanovená pri extrakte z paliny pravej, ktorá dosiahla 3,7%.

Po enkapsulácii bola posudzovaná aj stabilita vzniknutých častíc, a to podľa hodnoty ich zeta potenciálu. Všetky vzniknuté častice boli stabilné, okrem častíc s extraktom z materinej dúšky, ktorých ζ potenciál bol pod hodnotou stability -30 mV (-28 mV). Veľkosť častíc bola meraná metódou DLS. Častice s enkapsulovanými extraktmi boli v porovnaní s prázdnyimi časticami väčšie, pričom výnimkou boli častice s extraktom z rakytníka, ktorých priemerná veľkosť bola 162,3 nm.

Z výsledkov meraní dlhodobej stability enkapsulovaných zložiek do lipozómov je možné tvrdiť, že všetky častice boli stabilné. Výnimkou je len extrakt z nechtíka lekárskeho, pri ktorom bolo po troch týždňoch zaznamenané uvoľnenie takmer všetkých enkapsulovaných polyfenolov.

Nakoniec bola sledovaná antimikrobiálna aktivita voľných aj enkapsulovaných extraktov a lyzozýmu voči zástupcom gramnegatívnych baktérií *E. coli* a *S. marcescens*, a zástupcom grampozitívnych baktérií *M. luteus* a *B. subtilis*. Voči testovaným kmeňom vykazoval spomedzi použitých extraktov najvyšší antimikrobiálny účinok extrakt z echinacey purpurovej. Z porovnania výsledkov obsahu celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidantov s výsledkami antimikrobiálnych testov vyplýva, že tieto môžu prispievať k antimikrobiálnej aktivite daného extraktu, avšak nie sú to výhradne tie zložky, ktoré sú za túto aktivitu zodpovedné.

Najvyšší účinok, pri pôsobení extraktov enkapsulovaných v lipozómoch, bol zaznamenaný pri extraktoch z echinacey purpurovej, paliny pravej a sladkého drierka. Antimikrobiálny účinok lyzozýmu bol na obe skupiny mikroorganizmov, grampozitívne aj gramnegatívne, veľmi vysoký. Lyzozým, by tak spolu s extraktom z rakytníka rašetliakového, z echinacey

purpurovej a zo sladkého drievka mohol byť hlavnou súčasťou gélu s antimikrobiálnymi vlastnosťami. Tento gél by prostredníctvom lyzozýmu zabezpečoval okamžitý účinok voči baktériám, ktorý by bol podporený antimikrobiálnym účinkom pridaných bylinných extraktov, pričom vysoký obsah antioxidantov v extrakte z echinacey by mohol aj priaznivo pôsobiť pri regenerácii postihnutého miesta.

7 ZDROJE

- [1] EDITED BY RICHARD SCHWALBE, Lynn Steele-Moore. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 14-200-1449-8.
- [2] VOGT ..., Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 5., vollst. aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer, 2005. ISBN 35-402-1971-4.
- [3] DORMAN, H. J., DEANS, S. G.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils., J. Appl. Microbiol., 2000 vol. 88, no. 2, s. 308-316.
- [4] COWAN, M. M.: Plant products as microbial agents, Clin. Microbiol. Reviews, 1999, vol.12, no. 4, s. 564 – 582
- [5] FUNG, Daniel Y. C., C. C. SHEREE LIN a Mohamed B. GAILANI. Effect of Phenolic Antioxidants on Microbial Growth. Critical Reviews in Microbiology. 1985, vol. 12, issue 2, s. 153-183. DOI: 10.3109/10408418509104428. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10408418509104428>
- [6] SARMA, Abheri Sarma, Anisur Rahaman MALLICK a GHOSH. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. 2010, č. 3. Dostupné z: <http://www.ijpsr.info/docs/IJPSR10-01-03-04.pdf>
- [7] FATIMA, G, V P SHARMA, S K DAS a A A MAHDI. Oxidative stress and antioxidative parameters in patients with spinal cord injury: implications in the pathogenesis of disease. Spinal Cord. 2014-11-04, vol. 53, issue 1, s. 3-6. DOI: 10.1038/sc.2014.178. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sc.2014.178>
- [8] KALPNA, Rakholiya, Kaneria MITAL a Chanda SUMITRA. Vegetable and fruit peels as a novel source of antioxidants. Vegetable and fruit peels as a novel source of antioxidants. 2011, roč. 5, č. 1. Dostupné z: http://www.academicjournals.org/article/article1380533359_Kalpna%20et%20al.pdf
- [9] PÉREZ-JIMÉNEZ, J, V NEVEU, F VOS a A SCALBERT. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. European Journal of Clinical Nutrition. 2010, vol. 64, S112-S120. DOI: 10.1038/ejcn.2010.221. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ejcn.2010.221>
- [10] HAMILTON-MILLER, J. M. T. Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). 1995, roč. 39, č. 11. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162950/>
- [11] COOK, N. Flavonoids? Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Journal of the European Ceramic Society. 2004, s. 66-76. DOI: 10.1016/S0955-2863(95)00168-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286395001689--ku>
- [12] MSAADA, Kamel, Nidhal SALEM, Olfa BACHROUCH, Slim BOUSSELMi, Sonia TAMMAR, Abdulkhaleg ALFAIFY, Khaldoun AL SANE, Wided BEN AMMAR, Sana AZEIZ, et al. 2015. Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oils and

- Phenolics. *Journal of Chemistry*. **2015**: 1-12. DOI: 10.1155/2015/804658. ISSN 2090-9063. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/804658/>
- [13] Wormwood. 2009. *Drugs.com: Know more. Be sure.* [online]. [cit. 2015-05-15]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/npp/wormwood.html>
- [14] NIKOLIĆ, Miloš, Jasmina GLAMOČLIJA, Isabel C.F.R. FERREIRA, Ricardo C. CALHELHA, Ângela FERNANDES, Tatjana MARKOVIĆ, Dejan MARKOVIĆ, Abdulhamed GIWELI a Marina SOKOVIĆ. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. **52**(1): 183-190. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.10.006. ISSN 09266690. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901300558X>
- [15] STANISAVLJEVIĆ, Ivana, Saša STOJČEVIĆ, Dragan VELIČKOVIĆ, Vlada VELJKOVIĆ a Miodrag LAZIĆ. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2009, **17**(3): 478-483. DOI: 10.1016/S1004-9541(08)60234-7. ISSN 10049541. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1004954108602347>
- [16] KUMAR, K.M. a Sudha RAMAIAH. PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF ECHINACEA PURPUREA. *International journal of pharma and bio sciences IJPBS*. 2011, **2**(4). ISSN 0975-6299. Dostupné také z: http://ijpbs.net/vol-2_issue-4/pharma_science/34.pdf
- [17] SIRACUSA, Laura, Antonella SAIJA, Mariateresa CRISTANI, Francesco CIMINO, Manuela D'ARRIGO, Domenico TROMBETTA, Felice RAO a Giuseppe RUBERTO. Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves — Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*. 2011, **82**(4): 546-556. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.01.009. ISSN 0367326x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X1100030X>
- [18] GUPTA, Vivek K., Atiya FATIMA, Uzma FARIDI, Arvind S. NEGI, Karuna SHANKER, J.K. KUMAR, Neha RAHUJA, Suaib LUQMAN, Brijesh S. SISODIA, et al. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, **116**(2): 377-380. DOI: 10.1016/j.jep.2007.11.037. ISSN 03788741. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887410700640X>
- [19] EFSTRATIOU, Efstratios, Abdullah I. HUSSAIN, Poonam S. NIGAM, John E. MOORE, Muhammad A. AYUB a Juluri R. RAO. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2012, **18**(3): 173-176. DOI: 10.1016/j.ctcp.2012.02.003. ISSN 17443881. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1744388112000096>
- [20] GULIYEV, Vahid Bilaloglu, Mustafa GUL a Ali YILDIRIM. *Hippophae rhamnoides* L: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *Journal of Chromatography B*. 2004, **812**(1-2):

- 291-307. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.08.047. ISSN 15700232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023204007202>
- [21] Lysozym. ChemgaPedia [online]. 2014 [cit. 2015-01-08]. Dostupné z: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biokatalyse_enzyme/lysozym.vlu.html
- [22] Proteopedia. Proteopedia [online]. 2014, 19.8.2014 [cit. 2015-01-08]. Dostupné z: http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Hen_Egg-White_%28HEW%29_Lysozyme
- [23] Piercenet.com. Pierce Protein Biology Products [online]. 2015 [cit. 2015-01-08]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/product/lysozyme>
- [24] TORTORA, Gerard J, Berdell R FUNKE a Christine L CASE. Microbiology: an introduction. 11th ed. Boston: Pearson, c2013, xviii, 818, [121] p. ISBN 0321793102X.
- [25] European Centre for Disease Prevention and Contro. European Centre for Disease Prevention and Control [online]. 2015 [cit. 2015-01-09]. Dostupné z: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/basic_facts/pages/basic_facts.aspx
- [26] Biotechnology learning hub. Biotechnology learning hub [online]. 2014, 25.3.2014 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: http://biotechlearn.org.nz/themes/bacteria_in_biotech/e_coli_the_biotech_bacterium
- [27] Serratia spp.: Pathogen safety data sheet - infectious substances. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/serratia-spp-eng.php>
- [28] MEHRKE, Gerhard. *Scripte zur Vorlesung Biotechnologie: Beispiele nutzbarer Mikroorganismen* [online]. 2007 [cit. 2015-05-20]. Dostupné z: http://www.uni-ulm.de/IT/Scripte/Mikroorganismen_Beispile.pdf
- [29] Micrococcus: Pathogen safety data sheet - infectious substances. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>
- [30] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 49(11): 1749-1755. DOI: 10.1086/647952. ISSN 1058-4838. Dostupné také z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/647952>
- [31] IMMORDINO, Maria Laura, Franco DOSIO a Luigi CATTEL. 2006. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine* [online]. 3(1): 297-315 [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2426795/>
- [32] Ultrasonic liposome preparation. 2015. *Hielscher-Ultrasound Technology* [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: <http://www.hielscher.com/ultrasonic-liposome-preparation.htm>
- [33] RAHMAN, Misha, SEROTEC. Introduction to Flow Cytometry. Kidlington, 2005. Dostupné z: <https://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html>

- [34] LUTTMANN .., Werner.. Der Experimentator: Immunologie. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014. Berlin: Springer Berlin, 2014. ISBN 978-364-2418-983.
- [35] Flow cytometry@FOMD. Faculty of medicine and dentistry, University of Alberta, Canada [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://flowcytometry.med.ualberta.ca/>
- [36] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2014, (108): 479-482. ISSN 0009-2770. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf
- [37] Malvern Zetasizer Nano ZS: Dynamický rozptyl světla, zeta potenciál. KUZEL, Radomír. KRYSTALOGRAFICKÁ SPOLEČNOST. Karlova univerzita v Praze, Fakulta Matematicko-fyzikální, Katedra fyziky kondenzovaných látek, Oddělení strukturní analýzy [online]. Praha, 8.2.2008 [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [38] Stabilita suspenzí a disperzí- Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *CHEMagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2011, **21**(2). ISSN 1210-7409. Dostupné také z: http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet_Suspenze.pdf
- [39] Characterisation techniques. Nano composix europe [online]. 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <http://nanocomposix.eu/pages/characterization-techniques>